

Universitätsspital Zürich
Klinik für Gynäkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Fink

Arbeit unter Leitung von Dr. med. David Scheiner und Prof. Dr. med. Caroline Maake

Expression von Steroidhormon-Rezeptoren bei Frauen mit Zystozele

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Annemarie Ackerknecht-Koch
von Zürich ZH

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. Daniel Fink
Zürich 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	5
2.1 Genitaldeszensus	5
2.1.1 Definition	5
2.1.2 Epidemiologie	6
2.1.3 Ätiologie	8
2.1.4 Symptome	10
2.1.5 Therapie	11
2.2 Steroidhormone	13
2.2.1 Definition	13
2.2.2 Rezeptoren: Molekularbiologie und Isoformen	14
2.3 Ziel der Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Patientinnen	17
3.2 Ethik	18
3.3 Cryoschnitte	18
3.4 Hämatoxylin-Eosion Färbung	18
3.5 Laser Capture Microdissection Microscopy	18
3.6 RNA-Extraktion	19
3.7 Bestimmung der RNA-Konzentration	20
3.8 Reverse Transkriptase-Reaktion	20
3.9 Primer Design	21
3.10 Quantitative Polymerase Chain Reaction	23
3.11 Statistische Auswertung der qPCR	24
4. Resultate	25
4.1 Patientinnen	25
4.2 Laser Capture Microdissection Microscopy	25
4.3 RNA-Messung	27
4.4 Quantitative Polymerase Chain Reaction	28
4.4.1 Voruntersuchungen	28

4.4.2 qPCR	31
5. Diskussion	34
6. Literaturverzeichnis	40
7. Danksagung.....	43
8. Curriculum Vitae	44

1. Zusammenfassung

Hintergrund

Ein Genitaldeszensus bzw. Prolaps genitalis ist kein seltener Befund bei Frauen. Man geht davon aus, dass etwa 40% der Frauen im Alter von 50-79 Jahren einen gewissen Schweregrad eines Genitaldeszensus aufweisen. Am häufigsten ist das vordere Kompartiment in Form einer Zystozele betroffen. Es wird vermutet, dass sich ein Genitaldeszensus meist durch das Zusammenkommen verschiedener Faktoren und über mehrere Jahre hinweg entwickelt. Da viele Betroffene asymptomatisch sind, können nicht immer Rückschlüsse bezüglich der Ätiologie gezogen werden. Zu den gut etablierten Risikofaktoren gehören aber vaginale Geburten, Adipositas, fortgeschrittenes Alter und altersbedingte hormonelle Umstellungen der Menopause. So geht man davon aus, dass insbesondere Veränderungen der Spiegel von Sexualsteroiden eine Rolle für die Entstehung des Genitaldeszensus spielen könnten. Wenig erforscht sind hingegen mögliche Veränderungen der dazugehörigen Steroidhormon-Rezeptoren, deren Vorkommen bereits an diversen anatomischen Lokalisationen und an verschiedenen Geweben des Urogenitalsystems und Beckenbodens nachgewiesen werden konnten.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es nun, erstmals mittels einer Kombination von mikroskopischen Techniken (Laser Capture Microdissection Microscopy, LMD) und molekularen Methoden (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) spezifisch die Expressionsraten von Östrogenrezeptor α (ESR1), Östrogenrezeptor β (ESR2), Progesteronrezeptor (PGR) und Androgenrezeptor (AR) im Bindegewebe der vaginalen Vorderwand von Patientinnen mit und ohne Genitaldeszensus zu analysieren.

Methoden

Aus der vaginalen Vorderwand von Patientinnen mit (n=6) und ohne (n=6) Zystozele wurden Biopsien im Rahmen einer Hysterektomie oder einer Diaphragmaplastik entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von diesen Biopsien wurden 10 μm dicke Cryoschnitte hergestellt, aus welchen mit Hilfe der LMD eine standardisierte Fläche von 2 mm^2 Bindegewebe ausgeschnitten und separiert wurde. Die RNA des Bindegewebes wurde mit dem RNeasy® Micro Kit (QIAGEN, Hombrechtikon, Schweiz) extrahiert und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (QuantiTect® Reverse Transcription Kit,

QIAGEN). Alle Proben wurden nachfolgend einer qPCR unterworfen. Hierfür wurden unter Berücksichtigung aller bekannten Transkripte spezifische Primer für ESR1, ESR2, PGR und AR erstellt und qPCR-Standardkurven etabliert. Alle Ergebnisse wurden gegenüber der Expression eines Housekeeping Gens (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) normalisiert und mit Hilfe des Relative Expression Software Tools 384 analysiert.

Resultate

Der Versuch, anhand der LMD das Bindegewebe zu isolieren, stellte sich als eine genaue und zugleich unkomplizierte Technik heraus. Eine vorgängige Färbung oder eine chemische Fixierung der Schnitte erwies sich als nicht notwendig.

ESR2 war im Bindegewebe der vaginalen Vorderwand nicht exprimiert. Die relativen Expressionsanalysen von ESR1 und AR nach qPCR zeigten keine signifikanten Unterschiede der RNA-Level im vaginalen Bindegewebe zwischen Patientinnen mit und ohne Genitaldeszenus. Im Gegensatz dazu war bei Patientinnen mit Genitaldeszenus der PGR im Bindegewebe der vaginalen Vorderwand signifikant um den Faktor 6.5 herunterreguliert im Vergleich zu den Patientinnen ohne Genitaldeszenus.

Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass der im Bindegewebe der Vaginalwand vorkommende PGR eine wichtige Rolle in der Ätiologie der Zystozele, bzw. des Genitaldeszenus (Prolaps genitalis) spielen könnte. Ob die signifikant niedrigere Expression dieses Rezeptors eine Folge oder eine Ursache des Senkungszustandes ist und inwiefern unsere Daten auch auf andere Gewebekompartimente des kleinen Beckens zutreffen, muss in Zukunft noch erforscht werden.

2. Einleitung

2.1 Genitaldeszensus

Senkungszustände des weiblichen Genitale sind häufige Befunde. Für die Betroffenen stellen sie oft grosse Belastungen und eine deutliche Minderung der Lebensqualität dar, auch wenn der Zustand höchst selten lebensbedrohlich ist [1].

2.1.1 Definition

Unter einem Genitaldeszensus versteht man die Senkung bzw. den Vorfall von einer oder mehreren der folgenden Strukturen: der vaginalen Vorderwand, der vaginalen Hinterwand oder des Apex der Vagina (Zervix, Uterus oder Scheidenende nach Hysterektomie) [2]. Im Gegensatz zum Englischen „pelvic organ prolapse“ (POP), spricht man im deutschsprachigen Raum erst von Prolaps, wenn die maximale distale Ausdehnung über den Hymenalsaum hinausreicht, entsprechend einem Stadium II oder höher (siehe Tabelle 1), und zuvor von Deszensus.

Bei Beteiligung der vaginalen Vorderwand ist meist die Blase mit oder ohne Urethra (Zystozele, Zystourethrozele) betroffen. Die Vorwölbung der vaginalen Hinterwand ist typischerweise mit dem Rektum (Rektozele) assoziiert. Der Uterus (Deszensus bzw. Prolaps uteri) oder Anteile des Darms (Enterozele) sind meist bei der Vorwölbung des Apex der Vagina mitbeteiligt [3].

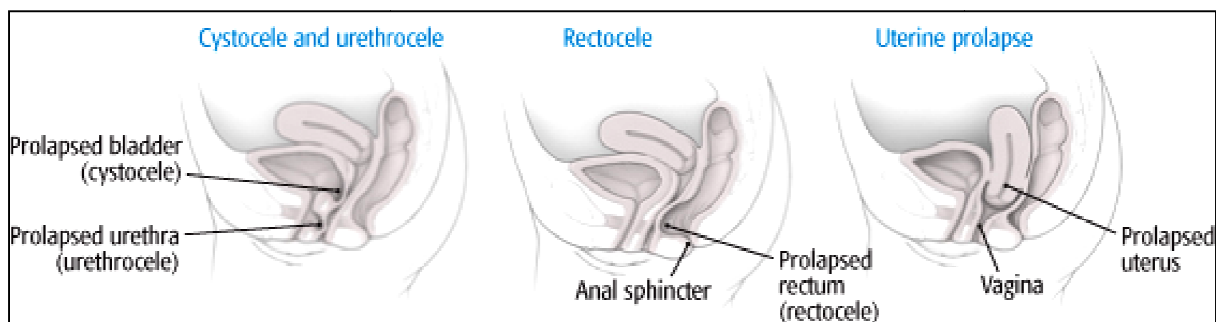


Abb. 1: Verschiedene Arten des Genitaldeszensus,
aus: <http://www.health.harvard.edu/fhg/updates/update0805c.shtml>, April 2012

Zystozelen können weiter in Pulsations- und Traktionszystozelen eingeteilt werden. Pulsationszystozelen befinden sich eher im kranialen Anteil der vaginalen Vorderwand. Charakteristisch für Pulsationszystozelen sind die verstrichenen Rugae mit dadurch glatter

Vaginalwand, als Zeichen des zentralen Defektes der endopelvinen Faszie. Dabei kommt es zur Senkung der Blase. Der vesikourethrale Übergangsbereich und die Urethra sind in der Regel noch gut fixiert. Traktionszystozelen entstehen durch Abriss der endopelvinen Faszie von der lateralen Beckenwand (Arcus tendineus fasciae pelvis). Bei körperlicher Anstrengung kann sich die Faszie nach kaudal verlagern, was zum Deszensus der Urethra und des vesikourethralen Übergangs führt. Die vaginalen Rugae bleiben erhalten [4].

Die Stadieneinteilung kann nach verschiedenen Schemata erfolgen. Die am häufigsten verwendete Stadieneinteilung erfolgt nach dem Pelvic Organ Prolapse Quantification System (POP-Q System)[5], welches unter anderem von der International Continence Society anerkannt worden und dadurch weltweit in Gebrauch ist [6]. Das POP-Q System teilt den Genitaldeszensus in fünf Grade ein (siehe Tabelle 1). Der Vorteil dieser Stadieneinteilung besteht darin, dass der Genitaldeszensus in Zentimeter gemessen und objektiviert werden kann. Bei der Untersuchung in dorsaler Steinschnittlage soll die maximale Ausdehnung des Genitaldeszensus erfasst werden. Diese ist erreicht, wenn die Vaginalwand maximal gedehnt ist, der Deszensus nicht weiter nach unten gezogen werden kann und die Patientin die maximale Senkung bestätigt. Als Referenzpunkt gilt der Hymenalsaum.

Grad 0	Kein Deszensus/Prolaps sichtbar.
Grad 1	Die maximale distale Ausdehnung liegt mindestens 1cm oberhalb des Hymenalsaumes.
Grad 2	Die maximale distale Ausdehnung liegt im Bereich des Hymenalsaumes und jeweils maximal 1cm oberhalb bzw. unterhalb davon.
Grad 3	Die maximale distale Ausdehnung liegt mindestens 1cm und maximal 2cm unterhalb des Hymenalsaumes.
Grad 4	Totalprolaps

Tab. 1: Stadieneinteilung gemäss POP–Q System [6]

2.1.2 Epidemiologie

Der Genitaldeszensus ist ein häufiges Problem in unserer Gesellschaft. Es wird angenommen, dass sich die Zahl der hilfeschenden Frauen in den nächsten 30 Jahren aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung in etwa verdoppelt. Die Anzahl der Konsultationen in Zusammenhang mit Beckenbodendysfunktionen nehmen proportional mit dem Alter bis zum 80. Lebensjahr kontinuierlich zu, fallen dann jedoch brüsk ab [7].

Wie in Tabelle 2 zusammengefasst, variiert die Verteilung der einzelnen Krankheitsbilder in den verschiedenen Altersgruppen.

	30-49 Jahre alt	50-89 Jahre alt
Belastungsinkontinenz	78 %	57 %
Überaktive Blase	56 %	67 %
Symptomatischer Deszensus bzw. Prolaps genitalis	27 %	30 %
Hypotone Urethra	0 %	5.3 %

Tab. 2: Statistische Analyse der Verteilung von Erkrankungen bei Frauen, welche bei Beckenboden-Dysfunktionen einen Arzt konsultieren [7]

In einer Studie aus den USA wurde bei 1004 Frauen im Alter von 18 bis 83 Jahren die Prävalenz der einzelnen Grade gemäss dem POP-Q System untersucht. In dieser Kohorte hatten 24% der Frauen einen Grad 0, 38% einen Grad 1, 35% einen Grad 2 und 2% einen Grad 3. Einen Grad 4 wurde bei keiner Frau diagnostiziert [8].

In der Women's Health Initiative [9] zeigten 41% der untersuchten Frauen im Alter von 50-79 Jahren einen Genitaldeszensus in mindestens einem Kompartiment. Eine Zystozele wurde bei 34.3% der untersuchten Frauen diagnostiziert, eine Rektozele bei 18.6% und einen Deszensus bzw. Prolaps uteri bei 14.2%. Frauen mit Status nach Hysterektomie hatten zu 32.9% Zystozelen und zu 18.3% Rektozelen [9].

Im Jahre 1997 wurden in den USA ca. 226'000 Deszensus- bzw. Prolaps-Operationen durchgeführt, welche direkte Kosten von über einer Milliarde Dollar produzierten [10]. Die vaginale Vorderwand ist mit 40.1% die am häufigsten operativ versorgte Struktur bei Senkungs- und Inkontinenzoperationen (siehe Tabelle 3) [11].

Vorderes Kompartiment	40.1%
Hinteres Kompartiment	7.3%
Apex	5.7%
Vorderes und hinteres Kompartiment	15.6%
Vorderes Kompartiment und Apex	8.6%
Hinteres Kompartiment und Apex	4.7%
Alle Kompartimente	18.0%

Tab. 3: Prozentuale Anteile der operativ versorgten anatomischen Strukturen [11]

Die Wahrscheinlichkeit, bis zum 80. Lebensjahr eine Deszensus- bzw. Prolaps-Operation oder Inkontinenz-Operation zu haben, liegt bei 11.1% [11]. Bei 13% folgt innert 6 Jahren nach primärer Operation eine Rezidivoperation [12]. Mit Zunahme der bereits durchgeführten Operationen nimmt der Zeitabschnitt zwischen den jeweiligen Eingriffen ab [11].

Es wurde auch gezeigt, dass interethnische Unterschiede bestehen [9]. Im Vergleich zur kaukasischen Bevölkerung hatten afroamerikanische Frauen das geringste,

lateinamerikanische Frauen hingegen das höchste Risiko für einen Genitaldeszensus und auch ein erhöhtes Risiko für Zystozelen. Rektozelen waren im Vergleich zur kaukasischen Bevölkerung nicht signifikant unterschiedlich.

2.1.3 Ätiologie

Ein Genitaldeszensus entwickelt sich meist über viele Jahre hinweg und entsteht aus einem Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren, also aus einer multifaktoriellen Genese. Höchst selten kann eine Patientin die Entstehung einem Ereignis oder einem Risikofaktor zuschreiben [13].

Es gibt viele Vermutungen über die Ätiologie und Pathogenese. Scheinbar gut etablierte Risikofaktoren wie tiefe Östrogenspiegel und das Alter werden in der Literatur kontrovers diskutiert [1]. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über etablierte und potenzielle Risikofaktoren.

Etablierte Risikofaktoren	Potenzielle Risikofaktoren
Vaginale Geburten Fortgeschrittenes Alter Übergewicht	Geburtshilfliche Faktoren <ul style="list-style-type: none"> - Schwangerschaft - Forzepsentbindung - Junges Alter (<25 Jahre) bei der ersten Geburt - Kindliches Geburtsgewicht von mehr als 4500g Beckenform Familienanamnese von Genitaldeszensus Ethnische Herkunft Beschäftigungen, welche das Heben schwerer Lasten erfordert Chronische Obstipation Erkrankungen des Bindegewebes Status nach Hysterektomie Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM's)

Tab. 4: Etablierte und potentielle Risikofaktoren [14]

Vaginale Geburten werden am häufigsten mit einem Genitaldeszensus assoziiert. Man vermutet, dass durch die Geburt die Muskeln, Nerven und das Bindegewebe des Beckenbodens direkt und indirekt verletzt werden [13]. Das Risiko steigt dabei mit der Anzahl der Geburten [15]. Als zusätzliches Risiko wird eine langandauernde Austreibungsphase vermutet [13].

Das Alter wird ebenfalls zu den etablierten Risikofaktoren gezählt. Die Prävalenz nimmt um etwa 40% pro Altersdekade zu [8]. Hand in Hand mit dem zunehmenden Alter geht der durch die Menopause hervorgerufene tiefe Östrogenspiegel [13].

Quantitative und qualitative Mängel an Kollagen, welche in Tabelle 4 nicht erwähnt wurden, werden in Verbindung mit der Entstehung eines Genitaldeszensus gebracht [13]. Doch ist man sich nicht im Klaren darüber, ob dies eine Ursache oder eine Folge des Genitaldeszensus ist [1]. Es wurde gezeigt, dass Östrogene den Kollagenmetabolismus positiv durch Aktivierung der Kollagensynthese beeinflussen [16].

Die Rolle tiefer Östrogenspiegel wird in der Literatur aber kontrovers diskutiert. Bei Rechberger *et al.* [16] zählen sie zu den Risikofaktoren, wohingegen Dietz *et al.* [1] einen Zusammenhang verneinen und dem tiefen Östrogenspiegel eine protektive Rolle zuteilt, da dadurch das Gewebe steifer werde.

Zur Pathogenese des Genitaldeszensus gibt es verschiedene Theorien. Die Haltevorrichtung des Beckenbodens wird durch eine komplexe Interaktion vom M. levator ani und dem Bindegewebe (endopelvine Faszie), welches die Beckenorgane an ihrem Platz hält, gewährleistet [14]. Der M. levator ani setzt sich aus dem M. pubococcygeus, dem M. puborectalis und dem M. iliococcygeus zusammen [14]. Wie diese Komponenten zusammenspielen und welcher Mechanismus schlussendlich zum Genitaldeszensus führt, konnte noch nicht bis ins letzte Detail erforscht werden [13].

Es wird vermutet, dass die Muskulatur durch direkte und indirekte Einflüsse geschädigt werden kann. Anhand der vaginalen Geburt lässt sich dies gut veranschaulichen [13]. In der Austreibungsphase kommt es zu einer enormen Dehnung der Muskulatur, insbesondere des M. pubococcygeus [17], mit konsekutiver Schwächung der Muskelkraft [13]. Diese kehrt bei den meisten Frauen innert zwei Monaten post partum zurück [18]. Permanente Schäden durch die starke Dehnung sind aber nicht auszuschliessen [13].

Indirekt kann die Muskulatur durch Nervenschädigung und Denervation beeinträchtigt sein, wie bei Frauen mit Status nach vaginalen Geburten oder mit chronischer Obstipation festgestellt worden ist [14, 19].

Eine weitere Theorie geht von ortsspezifischen Defekten aus, welche durch Risse in der endopelvinen Faszie die Entwicklung eines Genitaldeszensus ermöglichen. Einen Zusammenhang mit vaginalen Geburten besteht auch bei dieser Theorie [13].

2.1.4 Symptome

Frauen mit Genitaldeszensus können ganz unterschiedliche Symptome aufweisen. Gewisse bemerken nur einzelne, andere dagegen eine Kombination von Symptomen [14]. Viele sind asymptomatisch und haben somit keine Einschränkungen im Alltag [20]. Die Beschwerden können die Vagina, den Harntrakt, den Darm oder das Sexualleben betreffen [14]. In Tabelle 5 sind die Symptome aufgeführt.

Vagina	fühlen oder sehen einer Vorwölbung, Druck- oder Senkungsgefühl
Harntrakt	Inkontinenz, Frequency (häufiges Wasserlösen), Drangsymptomatik, schwacher oder verlängerter Harnstrahl, initiales Warten, Gefühl der inkompletten Blasenleerung, Notwendigkeit einer manuellen Reposition des Deszensus bzw. Prolaps um die Blase ganz zu entleeren, ändern der Körperposition um das Wasserlösen zu ermöglichen oder um die Blase komplett zu leeren
Darm	Luft-, Flüssigkeit- oder Stuhlinkontinenz, Gefühl der inkompletten Defäkation, pressen beim Stuhlgang, Drangsymptomatik, digitale Hilfe zur kompletten Defäkation, drücken oder schienen im Bereich der Vagina oder des Perineums zur vollständigen Defäkation, empfinden einer Blockade oder Obstruktion während des Stuhlgangs
Sexualleben	Dyspareunie

Tab. 5: Typische Symptome des Genitaldeszensus [14]

Mit Ausnahme des Fühlens oder Sehens einer vaginalen Vorwölbung ist keines der in Tabelle 5 genannten Symptome spezifisch für einen Genitaldeszensus. Ein empfundenes Symptom im Bereich eines Kompartimentes entspricht nur teilweise einem entsprechenden Defekt in demselben [21].

Das Stadium des Genitaldeszensus korreliert nicht zwingend mit dem Schweregrad der Symptome. So nehmen mit Zunahme des Genitaldeszensus, insbesondere im Bereich der vaginalen Vorderwand, Stressinkontinenz und Enuresis wieder ab [21]. Vielmehr kommt es zunehmend zu Blasenentleerungsstörungen. Eine Assoziation zwischen dem Schweregrad des Genitaldeszensus und Darmbeschwerden sowie Symptomen im Sexualleben ist nicht beschrieben [22].

Das Syndrom der überaktiven Blase (Overactive Bladder Syndrome, OAB) tritt vermehrt bei Frauen mit Genitaldeszensus auf. Nach konservativer oder operativer Behebung des Senkungszustandes nimmt die Häufigkeit von OAB deutlich ab. Als möglicher

Zusammenhang zwischen den beiden Krankheitsbildern wird die Obstruktion der Blase durch den Genitaldeszensus diskutiert [23].

2.1.5 Therapie

Wann eine Frau ihren Arzt aufsucht, ist individuell und hängt von der Symptomstärke bzw. der subjektiv empfundenen Verminderung der Lebensqualität ab [9]. Das weitere Vorgehen beim symptomatischem Genitaldeszensus kann exspektativ, konservativ mittels Anwendung von Pessaren oder chirurgisch sein [14].

Beobachten und Abwarten kann bei Frauen mit wenigen Symptomen besprochen werden. Meist handelt es sich in diesen Fällen um Senkungen, welche nicht über den Hymenalsaum hinausragen [14].

Die Pessartherapie ist derzeit die einzige konservative (nicht-operative) Therapieoption und kommt hauptsächlich bei Frauen zur Anwendung, welche keine Operation wünschen oder sich aufgrund von Nebenerkrankungen nicht dafür eignen [24].

Die operativen Techniken in der Deszensuschirurgie sind entweder rekonstruktiv oder obliterierend [14]. Rezidive sind keine Seltenheit. Die Wahl der korrekten Operationstechnik ist wichtig, um Rezidive möglichst zu vermeiden [25]. Meist sind mehrere Kompartimente der Vagina beim Genitaldeszensus betroffen [14]. Die korrekte präoperative Untersuchung dient der Diagnostik der verschiedenen Defekte [9], um diese nach Möglichkeit in einer kombinierten Operation zu versorgen [3]. Ziele einer rekonstruktiven Operation sind die Korrektur aller anatomischen Defekte, die Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der Blasen- und Darmfunktion sowie die Erhaltung der Kohabitationsfähigkeit [25].

Insbesondere empfiehlt sich, alle Frauen präoperativ bezüglich einer Belastungsinkontinenz zu untersuchen. Dabei wird bei gefüllter Blase der Genitaldeszensus mittels eines Tupfers oder Pessars reponiert und die Patientin zum Husten aufgefordert, um eine allfällig larvierte Belastungsinkontinenz demaskieren zu können. Das Vorgehen bei gleichzeitigem Auftreten von Genitaldeszensus und Belastungsinkontinenz wird in der Literatur diskutiert, doch fehlt ein Konsensus aufgrund der eingeschränkten Datenlage [26]. Eine Belastungsinkontinenz kann zum gleichen Zeitpunkt oder zweizeitig (als separater Eingriff zu einem späteren Zeitpunkt) operativ versorgt werden. Präventive Inkontinenzoperationen werden hingegen nicht empfohlen [27]. Bei der konkomitanten Versorgung der Belastungsinkontinenz wird weniger die erzielbare Kontinenz angezweifelt, als vielmehr die möglicherweise erhöhte

postoperative Rate an Komplikationen oder Blasenentleerungsstörungen unmittelbar nach operativer Sanierung einer Zystozele befürchtet [28].

Die chirurgische Sanierung kann auf transvaginalem, abdominalem, laparoskopischem oder roboterassistiertem laparoskopischem Weg erfolgen, wobei die transvaginale Variante am weitesten verbreitet ist [20, 27].

Bei der Kolpokleisis, als obliterierende Operationstechnik, werden die Beckenorgane reponiert und die Vagina ganz oder teilweise verschlossen. Diese Technik wird nur noch selten bei älteren, stark morbidem und sexuell inaktiven Frauen durchgeführt.

Klassische rekonstruktive Verfahren sind die Diaphragmaplastik, die Kolpoperineoplastik und die vaginale sakrospinale Fixation nach Richter [4]. Die Diaphragmaplastik erfolgt transvaginal und ist eine zentrale Fältelung der endopelvinen Faszie im Bereich der vaginalen Vorderwand mittels U-Nähten [14]. Laterale Defekte könnten mittels einer paravaginalen Kolpopexie zusätzlich versorgt werden. Die Kolpoperineoplastik entspricht der Diaphragmaplastik, mit dem Unterschied, dass die vaginale Hinterwand betroffen ist und gleichzeitig ein Dammaufbau erfolgen kann. Die bei der Diaphragma- oder Kolpoperineoplastik jeweils anfallende überschüssige Vaginalhaut wird sparsam reseziert und verworfen. Bei der vaginalen sakrospinalen Fixation wird der Apex der Vagina am Lig. sacrospinale befestigt.

Der vaginale Apex kann auch mittels der abdominalen oder laparoskopischen (ggf. roboterassistierten) Sakrokolpopexie rückverlagert werden. Bei dieser Operation wird der Scheidenstumpf (oder bei Uteruserhalt der Uterus) über ein Netz am sakralen Promontorium fixiert [27].

Potenzieller Nutzen des Einsatzes von Netzen sind eine bessere Wiederherstellung anatomischer Strukturen und eine bessere Prognose in Bezug auf Rezidive [20]. Netze können aus biologischen, resorbierbaren synthetischen oder nicht-resorbierbaren synthetischen Materialien bestehen. Nicht-resorbierbare Netze scheinen öfters Komplikationen, dafür bessere Langzeitresultate im Vergleich zu resorbierbaren Netzen zu erzielen [27]. Mögliche und teilweise schwer anzugehende Nebenwirkungen können Dyspareunie, Hispareunie (Dyspareunie des Partners), sekundäre Drangsymptomatik, Netzerosionen oder –shrinking sein [4]. Die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) veröffentlichte im Juli 2011 eine zweite Warnung an praktizierende Ärzte und Patienten

betreffend Komplikationen, die im Zusammenhang mit der transvaginalen Einlage von Netzen in der Behandlung des Genitaldeszensus stehen [29].

2.2 Steroidhormone

2.2.1 Definition

Steroidhormone sind Hormone, welche vom Cholesterin abgeleitet sind und lipophile bzw. hydrophobe Eigenschaften besitzen. Das Grundgerüst besteht jeweils aus drei C6-Ringen und einem C5-Ring. Sie werden nach Anzahl C-Atome eingeteilt in C21-Steroide (Gestagene, Mineralcorticosteroide und Glucocorticosteroide), C19-Steroide (Androgene) und C18-Steroide (Östrogene). Ihre Synthese aus Cholesterin findet in den Nebennierenrinden, den Gonaden, der Plazenta und im ZNS statt. Ein Spezialfall ist Calcitriol, welches durch die Zusammenarbeit von Haut, Leber und Niere entsteht.

In Bezug auf das Urogenitalsystem sind die Sexualsteroidhormone von grossem Interesse. Sie werden hauptsächlich in den Gonaden und der Plazenta produziert. Zu ihnen zählen Östrogene, Testosteron und Progesteron (siehe Abbildung 2).

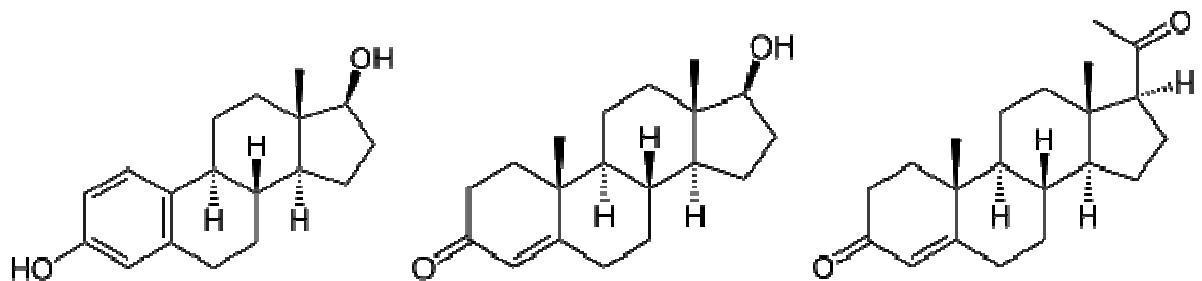


Abb. 2: Strukturformel von Östradiol, Testosteron und Progesteron, aus <http://de.wikipedia.org/wiki/Estradiol>, <http://de.wikipedia.org/wiki/Testosteron> und <http://de.wikipedia.org/wiki/Progesteron>, April 2012

Es existieren verschiedene Östrogene, wobei Östron (E1), Östradiol (E2) und Östriol (E3) zu den wichtigsten zählen. Von diesen ist Östradiol das wirksamste aufgrund seiner hohen Rezeptoraffinität. Die Produktion findet bei geschlechtsreifen Frauen überwiegend durch Granulosazellen im Ovarialfollikel und auch in Zellen des Corpus luteum statt. Nach der Menopause fällt die Östrogenproduktion durch die Ovarien aus, jedoch können bei adipösen Frauen die Adipozyten weiterhin Östrogene produzieren. In der Schwangerschaft werden Östrogene hauptsächlich durch die Plazenta gebildet [30].

Testosteron gehört zu den Androgenen. Bei Frauen wird es in geringen Mengen in den Thekazellen des Ovars und in der Nebennierenrinde produziert. Im Blutkreislauf ist das Testosteron zu 95% an ein Transportprotein, das sogenannte sexualhormonbindende Globulin (SHBG), gebunden. Dadurch wird die Bindung an den Androgenrezeptor und deren Folgen verhindert [30].

Progesteron ist ein Gestagen und wird in den Zellen des Corpus luteum hergestellt. Zu Beginn einer Schwangerschaft findet die Progesteronsynthese noch dort statt und wird im späteren Verlauf von der Plazenta übernommen [30].

Die Abnahme der Sexualhormone (vor allem Östrogen und Testosteron [31]) im Zusammenhang mit der Menopause wirkt sich auf das Gewebe des Urogenitalsystems aus und führt zu atrophischen Veränderungen [32]. Belastungsinkontinenz, OAB, rezidivierende Blasenentzündungen, Genitaldeszensus und vaginale Atrophie treten nach der Menopause vermehrt auf [16].

In verschiedenen Studien wurde die Wirkung von Sexualsteroiden auf das Urogenitalsystem und insbesondere die Folgen von tiefen Östrogenspiegeln auf die Urinkontinenz und auf den Beckenboden untersucht. So führen tiefe Östrogenspiegel unter anderem zu einer Verdünnung der Strukturen im Harntrakt, einer verminderten Reifung der Zellen in der Vagina und im Harntrakt, einer verminderten Muskelschicht in der Urethra und Blase, einem vermehrten Kollagenanteil in der Muskelschicht der Urethra und Blase sowie einer verminderten Vaskularisierung der Blase, des periurethralen Gewebes und des M. levator ani [32].

Die Rolle von Progesteron und Testosteron auf die einzelnen Strukturen im Urogenitalsystem ist noch wenig untersucht.

2.2.2 Rezeptoren: Molekularbiologie und Isoformen

Die Rezeptoren der Steroidhormone zählen zu den nukleären Rezeptoren. Sie befinden sich entweder im Zytoplasma oder im Zellkern der entsprechenden Zellen. Charakteristisch für nukleäre Rezeptoren sind eine ligandenbindende, eine DNA-bindende und eine regulative Region. Die lipophilen Steroidhormone entsprechen den Liganden und diffundieren durch die Zellmembran. Dort binden sie an den entsprechenden Rezeptor [33]. Der Rezeptor-Hormon-Komplex bindet wiederum an spezifische DNA-Abschnitte (=hormone responsive

elements), was zur Aktivierung oder Hemmung der Transkription bestimmter Gene führt [33, 34].

Östrogenrezeptoren sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren (www.genecards.org, April 2012). Zwei verschiedene Östrogenrezeptoren sind bekannt: Östrogenrezeptoren α (ESR1) und Östrogenrezeptoren β (ESR2). Beim Menschen befindet sich ESR1 auf dem Chromosom 6 und ESR2 auf dem Chromosom 14. Von diesen beiden Rezeptoren sind 14 bzw. 6 Isoformen bekannt. Die beiden Proteine sind sich sehr ähnlich, vor allem in der DNA- und ligandenbindenden Domäne. Unterschiede existieren vor allem in der N-terminalen, regulativen Domäne. Beide Rezeptoren interagieren mit denselben DNA-Abschnitten. Die Bindung von Liganden führt zu einer Konformationsänderung, welche die Bildung von Homo- oder Heterodimeren erlaubt. In diesem Zustand binden sie an bestimmte DNA-Abschnitte (=estrogen responsive elements) in der Promotorregion der Zielgene.

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein über 90 Kilo-Basenpaare (kb) langes Gen, welches sich auf dem X-Chromosom befindet (www.genecards.org, April 2012). Drei Isoformen sind bekannt. Der Rezeptor ist ebenfalls ein durch Steroidhormone aktivierter Transkriptionsfaktor. Nach der Bindung des Liganden dissoziieren inhibitorische Proteine, der Komplex wandert in den Nukleus, dimerisiert und stimuliert die Transkription bestimmter DNA-Abschnitte (=androgen responsive genes).

Der Progesteronrezeptor (PGR) befindet sich auf dem Chromosom 11 (www.genecards.org, April 2012). Das Gen hat zwei Promotoren und Translationsstartpunkte auf dem ersten Exon, welches zu den zwei Isoformen A und B des Rezeptors führt. Die beiden Isoformen unterscheiden sich nur durch die zusätzlichen 165 Aminosäuren am N-Terminus der Isoform B. Der Progesteronrezeptor existiert als Homodimer mit inhibitorischen Proteinen, welche nach der Bindung des Liganden dissoziieren. Der Hauptsignalweg des Progesteronrezeptors ist über direkte DNA-Bindung und Regulation der Transkription von Zielgenen.

Wie in Tabelle 6 ersichtlich, wurden im Urogenitalsystem und Beckenboden an verschiedenen Stellen Rezeptoren von Sexualsteroiden entdeckt [16].

	Östrogen-Rezeptoren	Progesteron-Rezeptoren	Androgen-Rezeptoren
Urethra	+	n. u.	+
M. sphincter urethrae	+	n. u.	n. u.
Periurethraler Venenplexus	+	n. u.	n. u.
Vagina	+	+	+
Trigonum vesicae	+	+	+
Beckeboden			
- Pubozervikale Muskulatur	+	n. u.	n. u.
- M. levator ani	+/-	n. u.	n. u.
- Lig. cardinale	+	+	n. u.
- Lig. sacrouterinum	+	+	n. u.
- Pubourethrale Faszie	+	-	n. u.
- Paravaginales Gewebe	+	-	n. u.

Tab. 6: Verteilung der Rezeptoren von Sexualsteroiden im Urogenitalsystem (n. u. = nicht untersucht) [16]

2.3 Ziel der Arbeit

Der Genitaldeszensus ist ein häufiges Problem, und die betroffenen Frauen leiden oft unter den Symptomen und der eingeschränkten Lebensqualität. Doch ist leider aktuell erst wenig fundiertes Wissen über die Ätiologie des Genitaldeszensus bekannt. Viele Hypothesen stehen im Raum und werden zum Teil kontrovers diskutiert. Umso wichtiger ist es, mit neuen Methoden die Ätiologie und Pathogenese des Genitaldeszensus sorgfältig zu untersuchen, um dadurch neue Präventions- oder Therapiemöglichkeiten zu eröffnen.

Wie in der Einleitung dargelegt, weisen bestehende Erkenntnisse darauf hin, dass sowohl Steroidhormone als auch Veränderungen des Bindegewebes eine Rolle in der Ätiologie des Genitaldeszensus spielen könnten. In unserer Arbeit haben wir daher die Expression der Steroidhormon-Rezeptoren (ESR1, ESR2, PGR, AR) spezifisch im Bindegewebe der vaginalen Vorderwand untersucht. Ziel dieser Pilotstudie war es, Unterschiede zwischen den Patientinnengruppen mit und ohne Zystozele aufzudecken und somit eine gute Ausgangslage für eine weiterführende Forschung zu schaffen.

3. Material und Methoden

3.1 Patientinnen

Im Zeitraum von Oktober 2008 bis Juli 2009 wurden Biopsien von Patientinnen der Klinik für Gynäkologie des Universitätsspitals Zürichs gesammelt, welche im Rahmen einer Hysterektomie (Gebärmutterentfernung) bei der Kontrollgruppe und Diaphragmaplastik bei der Fallgruppe entnommen werden konnten. Die Patientinnen waren 45 bis 74 Jahre alt. Patientinnen mit Zystozele (siehe Tabelle 7: 1-6) kamen in die Fallgruppe und Patientinnen ohne Zystozele (siehe Tabelle 7: 7-12) in die Kontrollgruppe.

Nr.	Alter (Jahre)	Meno-pausenstatus	Befund und Operationsindikation
1	72	post	Pulsationszystozele III, Deszensus uteri II
2	74	post	Pulsationszystozele III
3	64	post	Pulsationszystozele III, Deszensus uteri I
4	70	post	Pulsationszystozele II, Deszensus uteri I
5	45	prä	Pulsationszystozele II, Deszensus uteri I
6	64	post	Pulsationszystozele II, Vaginalstumpfdeszensus II
7	45	prä	Uterus myomatosus (670gr)
8	47	prä	Uterus myomatosus (480gr)
9	51	prä	Uterus myomatosus (882gr)
10	48	post	Uterus myomatosus (300gr)
11	46	prä	Blutungsstörungen, Uterus myomatosus, Genitaldeszensus I°(Uterus, Blase, Rektum)
12	50	prä	Hypermenorrhoe

Tab. 7: Patientendaten. Post: postmenopausal; prä: prämenopausal.

Die entnommenen Biopsien stammten aus der vorderen Vaginalwand (VW) und wurden anlässlich der Hysterektomie (Kontrollgruppe) apikal oder im Rahmen der Diaphragmaplastik (Fallgruppe) über der Zystozele entnommen. Die Biopsien wurden gleich nach der Entnahme noch im Operationssaal entgegengenommen, in Stücke von circa 0.5 cm³ zerschnitten und sogleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben im Gefrierschrank (-80°C) zwischengelagert.

3.2 Ethik

Die Genehmigung der Ethikkommission (SPUK für Gynäkologie, Geburtshilfe und Urologie USZ: StV 11/2009) liegt vor und die Einverständniserklärungen der Patientinnen wurden zuvor eingeholt (Dr. med. D. Scheiner).

3.3 Cryoschnitte

Aus den zwischengelagerten Biopsien wurden bei -25°C Cryoschnitte von $10\text{ }\mu\text{m}$ Dicke angefertigt und auf speziell für Laser Capture Microdissection Microscopy geeignete Slides



Abb. 3: MMI Slides

transferiert (MMI membrane mounted metal frame Slides, RNase free; MMI Molecular Machines & Industries AG, Glattbrugg, Schweiz). Die Slides bestehen aus einem Metallrahmen mit einer zentralen thermoplastischen Membran (siehe Abbildung 3).

Die mit Cryoschnitten versehenen Slides wurden als nächstes sofort getrocknet. Dazu wurden die Slides für zwei Minuten in Aceton getaucht, fünf Minuten an der Luft getrocknet, 30 Sekunden in 100% Ethanol gelegt, fünf Minuten in Xylol getaucht und zum Schluss 30 Minuten in der Kapelle getrocknet. Zur Zwischenlagerung wurden die Slides wieder im Gefrierschrank (-80°C) deponiert.

3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Von jeder Biopsie wurde zusätzlich ein Schnitt für eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung angefertigt. Die Schnitte wurden dazu fünf Minuten mit 4% Formalin fixiert, kurz in Phosphatpuffer pH 7.3 gewaschen, anschliessend drei bis fünf Minuten mit Hämalan gefärbt, zehn bis fünfzehn Minuten in Leitungswasser gebläut und fünf bis zehn Minuten in 0.1% Eosinlösung auf alkoholischer Basis gefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte in 80% Ethanol differenziert und jeweils drei bis fünf Minuten zuerst in 100% Ethanol und danach in Xylol inkubiert.

3.5 Laser Capture Microdissection Microscopy

Für die Laser Capture Microdissection Microscopy (LMD) wurden das Nikon Eclipse TE300 Mikroskop, der UV-Laser und das dazugehörige Computerprogramm MMI (MMI Molecular

Machines & Industries AG) verwendet. Wichtig war, dass während der ganzen Zeit Handschuhe getragen wurden, um Kontaminationen zu vermeiden.

Bevor die Schnitte mit dem Laser bearbeitet werden konnten, mussten sie für 30 Minuten in der Kapelle aufgetaut werden. In dieser Zeit konnte man sich anhand des HE-gefärbten Folgeschnittes bereits orientieren, wo Epithel, Muskel- und Bindegewebe vorhanden waren. Das aufgetaute Slide konnte nun in das Mikroskop eingespannt und in zwanzigfacher Vergrößerung computergesteuert bearbeitet werden. Die Helligkeit der Kamera wurde auf „Short (1/4000)“ und „White Balance“ eingestellt. Optimal für das Ausschneiden des Bindegewebes waren die Laserparameter „speed 22%“, „focus 45%“ und „power 100%“. Nun wurden noch das Objektiv und der Laser kalibriert, um ein genaues Arbeiten zu ermöglichen.

Ein offenes Tube (Isolation Caps 500 µl, tube with adhesive lid, without diffusor; MMI Molecular Machines & Industries AG), an dessen Deckel die gelaserten Stücke später haften sollten, wurde eingespannt und unter mikroskopischer Kontrolle über der gewünschten Stelle des Slides platziert.

Anschliessend wurde das Bindegewebe der Schnitte mit der Maus auf dem Computerbildschirm markiert und mit dem UV-Laser ausgeschnitten. Nachdem aus jedem Schnitt Bindegewebe einer Fläche von 2 mm² ausgeschnitten worden war, wurde das Tube vorsichtig auf das Slide gesenkt und gleich wieder angehoben, um mikroskopisch zu kontrollieren, ob die Stückchen am Deckel hafteten und um ihn an eine neue Stelle zu setzen.

3.6 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das RNeasy® Micro Kit (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Schweiz) gemäss Protokoll des Herstellers verwendet. Alle benötigten Lösungen waren im Kit enthalten. Wichtig war, dass die ganze Zeit auf Eis gearbeitet wurde und Handschuhe getragen wurden.

Direkt nach der LCM wurden 345 µl Lysis-Buffer mit 1% β-Mercaptoethanol und 5 µl Carrierlösung in die Tubes (MMI Molecular Machines & Industries AG) gegeben. Mit dem Deckel nach unten wurde das Tube auf dem Vortex für eine Minute gemischt, fünf Minuten auf Eis gelegt und anschliessend nochmals für eine Minute auf dem Vortex gemischt.

Nach diesem Arbeitsschritt konnten die Tubes entweder im Gefrierschrank (-80°C) aufbewahrt oder gleich weiterverarbeitet werden. Ersteres erforderte, dass die Tubes in aufgetautem Zustand erneut auf dem Vortex gemischt werden mussten, bevor sie weiter verarbeitet werden konnten.

Als nächstes konnte nach einer kurzen Zentrifugation der gesamte Tubeinhalt in ein neues 1 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und mit 350µl 70% Ethanol gemischt werden. Der Inhalt wurde sodann in eine Säule (RNeasy MinElute Spin Column; QIAGEN AG) umpipettiert und für 30 Sekunden bei 11'000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen. Als nächstes wurden 350 µl RW1 Buffer in die Säule pipettiert, welche dann für 15 Sekunden bei 11'000 rpm zentrifugiert wurde. Der entstandene Durchfluss wurde wiederum verworfen. Nun gab man 500 µl RPE Buffer in die Säule, zentrifugierte das Ganze erneut für 15 Sekunden bei 11'000 rpm und verwarf den Durchfluss. Im folgenden Schritt wurden 500 µl 80% Ethanol hinzugefügt. Die Säule wurde sodann für zwei Minuten bei 11'000 rpm zentrifugiert und in einen neuen 2 ml Collection Tube aus dem RNeasy® Micro Kit gesteckt, in welchem sie ausnahmsweise offen für fünf Minuten bei 14'500 rpm zentrifugiert wurde. Anschliessend wurde die Säule in ein 1.5 ml LoBind Tube (Eppendorf AG) gestellt. Als letztes gab man 15 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Membran der Säule, zentrifugierte sie für eine Minute bei 14'500 rpm und stellte das LoBind Tube mit dem RNA-haltigen Eluat ins Eis. Die Säule selber wurde nach dem letzten Schritt entsorgt. Nun konnte entweder mit der RT-Reaktion weitergefahren werden oder man stellte das LoBind Tube zur Aufbewahrung in den Gefrierschrank (-80°C).

3.7 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um nach der RNA-Extraktion den RNA-Gehalt der Proben zu bestimmen, wurde eine NanoDrop-Messung (ND-1000, Spectrophotometer; Witec AG, Littau, Schweiz) sowohl mit mikrodissiziertem Bindegewebe, wie auch mit einzelnen Cryoschnitten einer Biopsie durchgeführt.

3.8 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die reverse Transkriptase (RT) -Reaktion wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QIAGEN AG), welches bereits alle nötigen Lösungen enthielt, durchgeführt. Während der gesamten Zeit mussten Handschuhe getragen und auf Eis gearbeitet werden.

Der erste Schritt der RT-Reaktion war die Eliminierung der genomischen DNA (gDNA). Dazu wurden 2 µl gDNA Wipeout Buffer mit 12 µl Template RNA (aus der RNA-Extraktion) gemischt, für zwei Minuten bei 42°C im Wasserbad inkubiert und wieder ins Eis gestellt.

In einem zweiten Schritt wurde sodann die RNA in cDNA transkribiert. Hierzu wurde ein RT-Mastermix aus 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase (Enzym), 4 µl Quantiscript RT Buffer und 1 µl RT-Primer Mix hergestellt und zu den 14 µl der ersten Reaktion hinzugegeben. Im Falle der Negativkontrolle (RT \ominus) wurde anstelle des Enzyms 1 µl RNase-freies Wasser beigelegt. Das Ganze wurde für 15 Minuten bei 42°C im Wasserbad inkubiert, anschliessend für drei Minuten auf 95°C erhitzt und zur Aufbewahrung in den Gefrierschrank (-20°C) gestellt.

3.9 Primer Design

In Tabelle 8 sind die einzelnen Primer und deren Sequenzen, die dazugehörigen Probes der Probe Library (Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz) sowie die errechneten Grössen der Amplikons aufgelistet.

Für das Design der Primer wurden aus einer Genom-Datenbank (www.ensembl.org, April 2012) zuerst die humanen Versionen der Gene von den zu untersuchenden Rezeptoren (AR, PGR, ESR1 und ESR2) und zweier Housekeeping Gene (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH und beta-2-Microglobulin, B2M) herausgesucht und - soweit vorhanden - deren Isoformen identifiziert. Die entsprechenden cDNA-Formen der verschiedenen Isoformen eines Gens wurden anschliessend aliniert (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html, April 2012), um Regionen zu finden, in welchen die Sequenzen der Isoformen eines Gens identisch waren. Die so identifizierten Sequenzen wurden in die Primer-Software des Probe-Library Systems (www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp, April 2012) eingegeben, um passende Primer-Paare (sense und antisense) zu erhalten. Zur Kontrolle der Spezifität der Primer-Sequenzen wurden anschliessend alle Primer mit der BLAST-Software überprüft („Nucleotide BLAST“; www.ncbi.nlm.nih.gov, April 2012). Alle Probes (Probe Library System, Roche) waren kurze Hydrolyse-Proben, welche mit FAM markiert sind.

Alle verwendeten Primer wurden kommerziell synthetisiert (Microsynth AG, Balgach, Schweiz) und lyophilisiert geliefert. Sie wurden vor Gebrauch in einer Stocklösung von 100 µM mit RNase-freiem Wasser gelöst und im Gefrierschrank (-20°C) zwischengelagert.

Gen	Abkürzung	Iso- for- men	Probe	Cat. no.	sense Primer (3'-5')	antisense Primer (3'-5')	Ampli- kon
Androgenrezeptor	AR_PL14	3	# 14	04685130001	gccttgctctctagcctcaa	gtgctccagctgtaagtgc	102 nt
Progesteronrezeptor	PGR_PL20	2	# 20	04686934001	ccgcccctatctcaactacc	atgactcgaagctgtattggg	71 nt
Östrogenrezeptor α	ESR1_PL78	12	# 78	04689011001	atggccctactgcatcaga	caggggatcttgagctg	72 nt
Östrogenrezeptor α	ESR1_PL22	2	# 22	04686969001	tcctaacttgctcttgacagg	gtagccagcagcatgtcg	78 nt
Östrogenrezeptor β	ESR2_PL69	6	# 69	04688686001	aaaaactcaccatctagccttaattc	ccaggggtaagatggattga	67 nt
Östrogenrezeptor β	ESR2_PL24	6	# 24	04686985001	gcaaggccaagagaagtgg	tccagggagggtgagcacta	94 nt
Glycerinaldehyd-3- Phosphat- Dehydrogenase	GAPDH_PL45	9	# 45	04688058001	gagtcacactggcgctcttcac	ttcacccccatgacgaacat	119 nt
Beta-2-Microglobulin	B2M_PL42	3	# 42	04688015001	ttctggcctggaggctatc	tcaggaaatttgactttccattc	86 nt

Tab. 8: Sequenzen der
Primer

3.10 Quantitative Polymerase Chain Reaction

Für jede quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) wurde ein Mastermix als Basis zusammengemischt. Für 10 µl brauchte man 5 µl 2x Stocklösung (qPCR-Mastermix von ABgene; VWR International AG, Dietikon, Schweiz), 0.1 µl Probe Library Probe (Roche, 10 µM), 0.2 µl sense Primer (20 µM), 0.2 µl antisense Primer (20 µM) und 2.5 µl RNase-freies Wasser. Zu beachten war, dass die Probes und die Primer bei jedem Gen verschieden waren und deshalb jeweils pro Gen ein anderer Mastermix hergestellt werden musste.

Das Reaktionsvolumen pro qPCR war 10 µl: 8 µl Mastermix mit jeweils genspezifischen Primer/Probe-Kombinationen (siehe oben) und 2 µl Template (1 µl cDNA der entsprechenden Patientin/Kontrolle + 1 µl RNase freies Wasser). Dies wurde in sterile qPCR-Platten (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml), PCR compatible, DNA/RNA/RNase free; Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz) pipettiert. Als Negativ-Kontrollen wurden RT⁻-Reaktionen sowie Reaktionen, bei denen RNase-freies Wasser statt cDNA verwendet wurde, pipettiert. Alle Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt. Ausserdem wurden die Pipettenspitze nach jedem Gebrauch gewechselt, um Pipettierfehler zu vermeiden. Auf die jeweilige Platte wurde anschliessend sorgfältig eine Folie (MicroAmp® Optical Adhesive Film, PCR compatible, DNA/RNA/RNase free; Applied Biosystems) geklebt, um die Vertiefungen möglichst dicht zu verschliessen. Anschliessend wurde die Platte in die Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0; DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England) gestellt, um einen „Quick run“ (bis 600 rpm) durchzuführen. Danach konnte die Platte in die eingeschaltete qPCR-Maschine (7500 Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems) gelegt und auf dem Computer das Programm „7500 Fast System Software“ geöffnet werden. Nun wurde auf „Create new document“ geklickt und im neu erscheinenden Fenster die „Assay“-Einstellung „ddCt (Relative Quantitaion) Plate“ ausgewählt. Die qPCR-Konditionen waren entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Probe Library, Roche) wie folgt: 15 Minuten Denaturierung bei 95°C, danach 40 Zyklen bestehend aus jeweils 15 Sekunden bei 95°C und einer Minute bei 60°C.

Um die Effizienzen der verschiedenen Primer/Probe-Kombinationen in der qPCR zu bestimmen, wurden ausserdem Standardkurven unter Verwendung standardisierter Verdünnungen von cDNA hergestellt. Ausgangsmaterial waren hierfür Cryoschnitte der

vorderen Vaginalwand, mit welchen man ohne vorherige LMD eine RNA-Extraktion und eine RT-Reaktion, wie oben beschrieben, durchgeführt hatte.

Die Reaktionen wurden prinzipiell so durchgeführt, wie oben für die qPCR beschrieben, aber mit folgenden Modifikationen: zu 8 µl Mastermix wurden 2 µl cDNA (in folgenden fünffach Verdünnungen mit RNase-freiem Wasser: unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125; 1:625; 1:3125) in qPCR-Platten (Applied Biosystems) pipettiert. Bei den Geräteeinstellungen wurde die „Assay“-Einstellung in „Standard Curve (absolute quantitation)“ geändert. Die qPCR-Bedingungen waren ansonsten wie oben beschrieben.

Bei allen qPCR-Ansätzen (experimentelle Serien und Standardkurven) wurden folgende Negativ-Kontrollen mitgeführt:

- 1.) Reaktionen, bei denen RNase-freies Wasser anstelle des Enzyms verwendet wurde (RT \ominus , siehe 3.8).
- 2.) Reaktionen, bei denen RNase-freies Wasser statt cDNA verwendet wurde.

Alle Ansätze wurden entweder als technische Triplikate (Standardkurven) oder technische Duplikate (LMD-Samples) durchgeführt. Ausserdem wurden die Pipettenspitzen nach jedem Gebrauch gewechselt, um Pipettierfehler zu vermeiden.

3.11 Statistische Auswertung der qPCR

Für die statistische Auswertung wurde das Relative Expression Software Tool (REST 384; <http://rest.gene-quantification.info>; April 2012) verwendet. Es schliesst einen Normalisierungsschritt der Expressionsraten für jedes Sample in Bezug auf ein nicht reguliertes Referenzgen (GAPDH) ein. REST basiert auf einem Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test und errechnet allfällige signifikante Unterschiede zwischen der Fall- und Kontrollgruppe. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

4. Resultate

4.1 Patientinnen

Je sechs Patientinnen wurden in die Fall- oder Kontrollgruppe eingeteilt. Das Durchschnittsalter in der Fallgruppe war mit 65 Jahren höher als das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe (48 Jahren). Fünf von sechs Patientinnen der Fallgruppe waren bereits in der Menopause, wogegen fünf von sechs Frauen in der Kontrollgruppe prämenopausal waren.

In der Fallgruppe hatten drei Patientinnen eine Pulsationszystozele Grad II und drei Patientinnen eine Pulsationszystozele Grad III. Die sechs Patientinnen der Kontrollgruppe wurden wegen Uterus myomatosus oder Blutungsstörungen operiert. Eine Patientin (Nr. 11) wies nur einen geringgradigen Genitaldesenzus Grad I (Uterus, Blase, Rektum) auf und wurde der Kontrollgruppe zugeordnet.

Alle Samples konnten innerhalb von zwei bis drei Minuten nach der Entnahme eingefroren und damit unter weitgehend gleichen Bedingungen asserviert werden.

4.2 Laser Capture Microdissection Microscopy

Alle Gewebeproben liessen sich problemlos cryoschneiden und färben. Subepitheliales Bindegewebe (Lamina propria) war in allen Samples vorhanden, allerdings war die Identifikation dieses Kompartiments im Phasenkontrast-Modus des LMD teilweise schwierig. In dieser Situation waren die HE-Schnitte (Folgeschnitte zu den Cryoschnitten) eine grosse Hilfe, da bei diesen die Identifizierung der einzelnen Strukturen unter dem Lichtmikroskop eindeutig war (siehe Abbildung 4).

Bei den Biopsien Nr. 9 (Kontrollgruppe) und Nr. 4 (Fallgruppe) war das Bindegewebe teilweise durchzogen von dünnen Bündeln glatter Muskulatur.

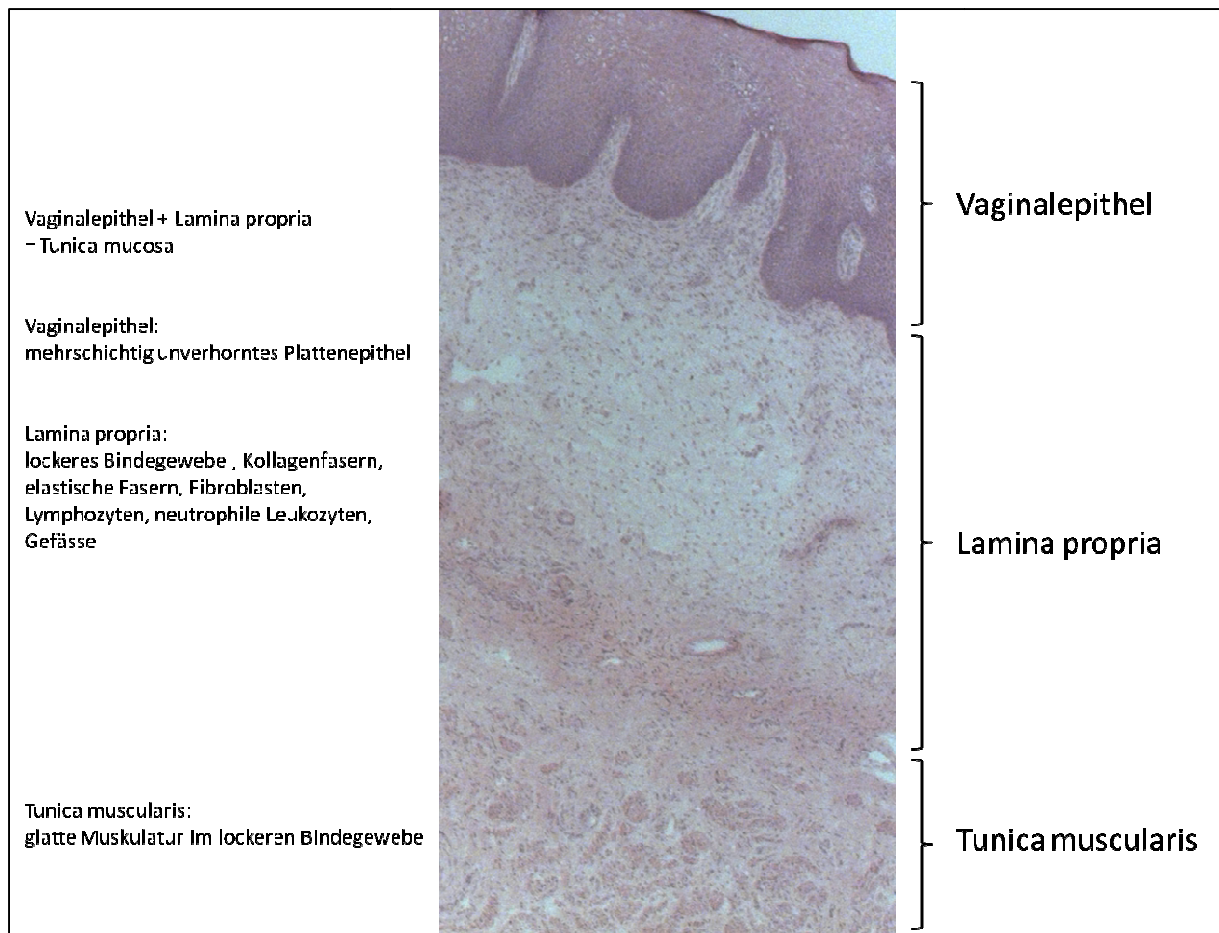


Abb. 4:
Vaginalwand Mensch, Cryoschnitt 10 µm dick, Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung, Originalvergrößerung x10

Wie in den Abbildungen 5 und 6 veranschaulicht, variierte die Dichte des Bindegewebes von Biopsie zu Biopsie. Einen Zusammenhang zwischen der Dichte des Bindegewebes und dem Vorhandensein einer Zystozele fand sich bei unserem Patientenkollektiv nicht.

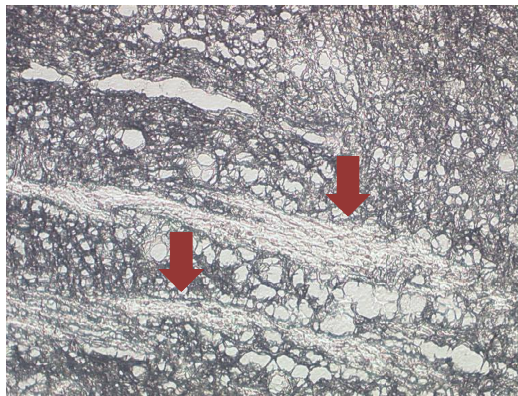


Abb. 5: Dichtes Bindegewebe der Lamina propria mit glatten Muskelfaserbündeln (Pfeile)

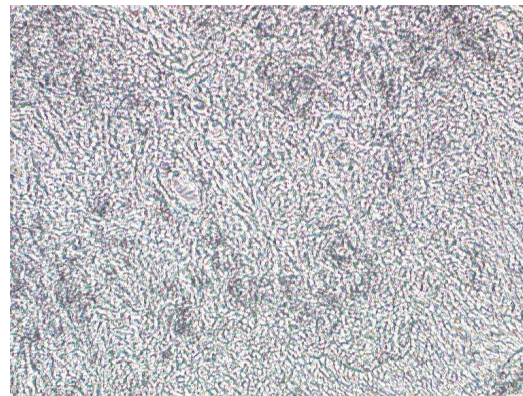


Abb. 6: Relativ lockeres Bindegewebe ohne Muskelbündel

Die einzelnen Schritte der LMD sind in den Abbildungen 7 bis 10 chronologisch dargestellt. Je dichter das Bindegewebe, desto häufiger musste der Laservorgang zur Dissektion wiederholt werden. In 7 von 12 Fällen genügte ein einmaliger Schneidevorgang, in 4 von 12 Fällen wurden zwei Schneidevorgänge und in 1 von 12 Fällen wurden drei Schneidevorgänge benötigt.

Von allen Patientinnen konnten jeweils 2 mm² Bindegewebe der Lamina propria gewonnen werden. In allen Fällen wurden dafür zwei Cryoschnitte verwendet (je 10 µm dick).



Abb. 7: Übersicht der Lamina propria und des epithelialen Randes (rechts der eingezeichneten Linie)

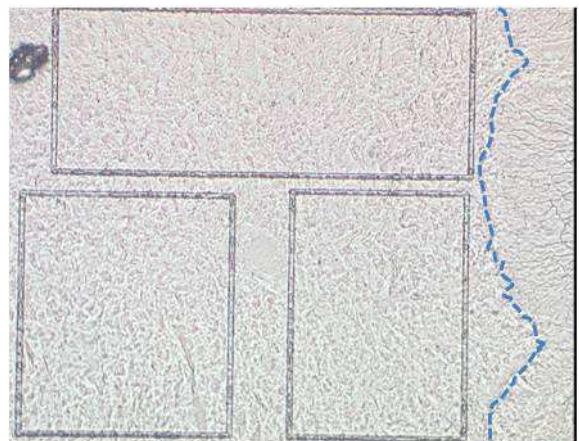


Abb. 8: Mit Laser ausgeschnittene Areale der Lamina propria (Bindegewebe)

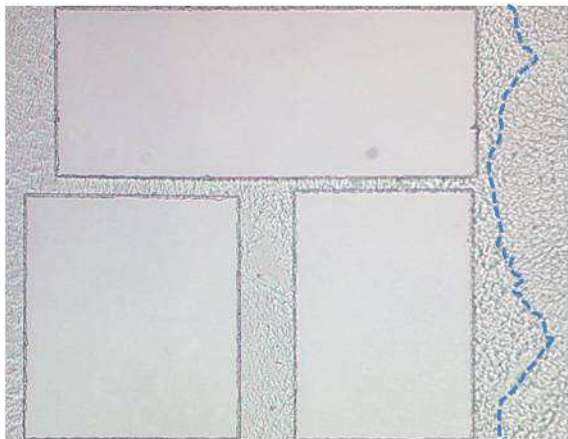


Abb. 9: Präparat nach Entfernung der gelaserten Stücke

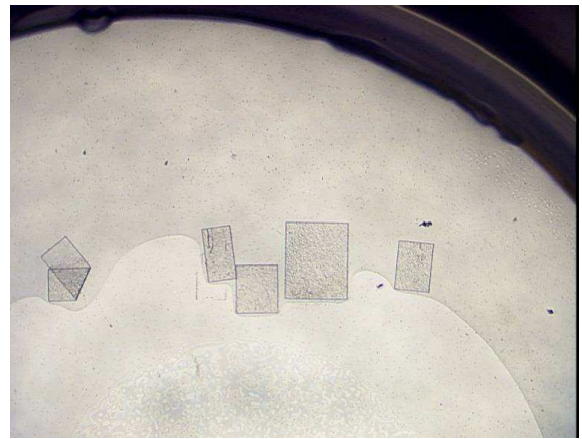


Abb. 10: Gelaserte Stücke am Deckel des Tubes

4.3 RNA-Messungen

Anfängliche Testmessungen mit dem NanoDrop zeigten, dass eine zuverlässige Bestimmung der RNA-Mengen von laserdisseziertem Bindegewebe nicht möglich ist. Die RNA-Konzentrationen (ng/µl) schwankten bei wiederholten Messungen eines einzigen Samples sehr stark. Im Gegensatz dazu schwankten die RNA-Messungen nach Extraktion eines ganzen

(nicht-dissezierten) Cryoschnittes der vorderen Vaginalwand und unter Verwendung der gleichen Extraktionsmethode nicht so stark. Die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 zu 280 nm ($A_{260/280}$), welches ein Mass für die Reinheit der Extraktion darstellt, zeigte ebenfalls bei laserdisseziertem Material grosse Schwankungen bei Doppelmessungen und insgesamt sehr hohe Werte. Dies war nach Extraktion des ganzen Cryoschnittes nicht der Fall, wo zuverlässig der gewünschte Wert von etwa 2.0 erzielt werden konnte. In Tabelle 9 sind die Resultate der NanoDrop-Messung nochmals zusammengefasst.

Sample ID	ng/ μ l	A260	A280	A260/280	260/230
LMD, Nr. 1 1. Messung	4.09	0.102	0.032	3.22	0.02
LMD, Nr. 1 2. Messung	2.16	0.054	0.006	8.73	0.01
Cut, Nr. 1 1. Messung	38.51	0.963	0.468	2.06	0.24
Cut, Nr. 1 2. Messung	48.73	1.218	0.601	2.03	0.24

Tab. 9: NanoDrop-Messung (LMD =lasermikrodisseziertes Bindegewebe, Cut = Kryoschnitt der gesamten Vaginalwand)

4.4 Quantitative Polymerase Chain Reaction

4.4.1 Voruntersuchungen

Die Analyse von Expressionsmustern verschiedener Gene setzt voraus, dass alle verwendeten Primer/Probes verschiedene cDNA-Mengen mit der gleichen Effizienz amplifizieren. Da dies häufig nicht der Fall ist, muss, um rechnerisch einen Korrekturfaktor einbeziehen zu können, zunächst die Effizienz der einzelnen Primer/Probe-Kombinationen mit Hilfe von Standardkurven berechnet werden.

Um eine aussagekräftige Standardkurve zu erhalten, wurde die Verdünnung der cDNA so gewählt, dass die Standardkurve mindestens vier Punkte enthielt (siehe Abbildungen 11-15). Zwischen dem Logarithmus der verwendeten cDNA-Verdünnung und dem Cycle Threshold (Ct) sollte jeweils eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung bestehen, bei welcher eine Steigung (Slope) von -3.3 einer Effizienz von 100% entspricht.

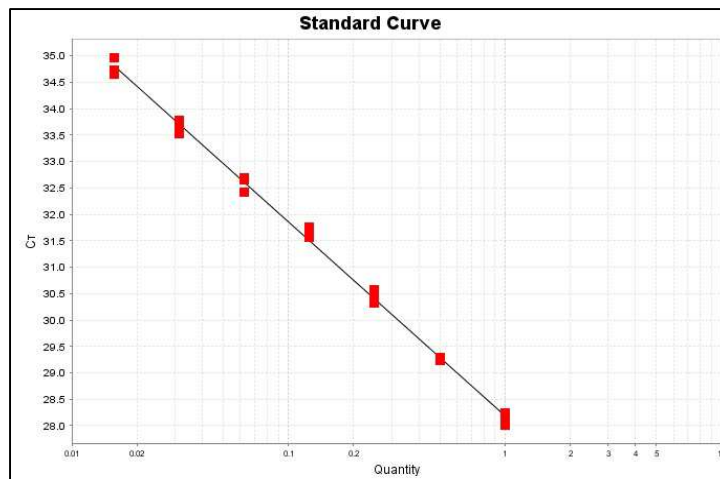


Abb. 11: qPCR-Standardkurve für Primer/Probes für den AR, unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von cDNA-Konzentrationen (1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125, 1:15625).

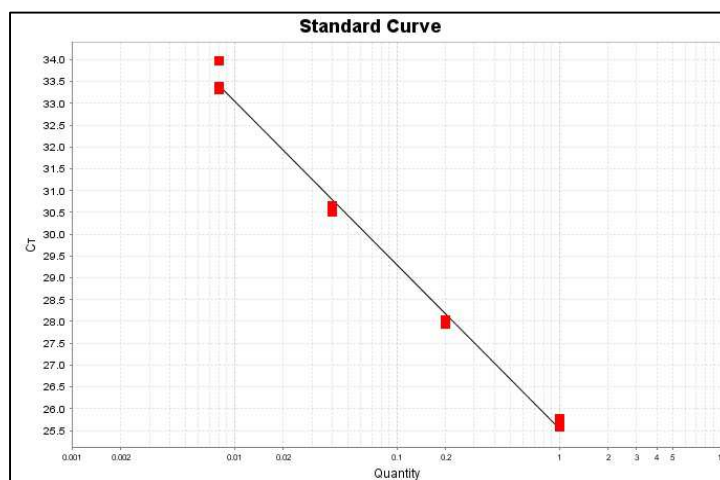


Abb. 12: qPCR-Standardkurve für Primer/Probes für den PGR, unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von cDNA-Konzentrationen (1:1, 1:5, 1:25, 1:125).

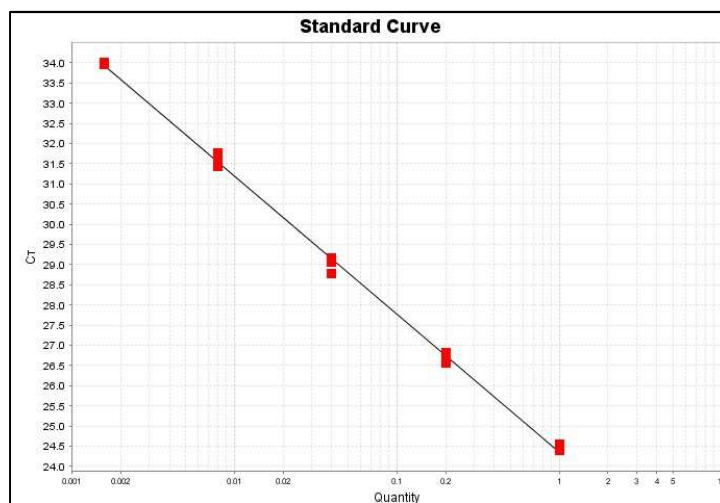


Abb. 13: qPCR-Standardkurve für Primer/Probes für ESR1_1, unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von cDNA-Konzentrationen (1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625).

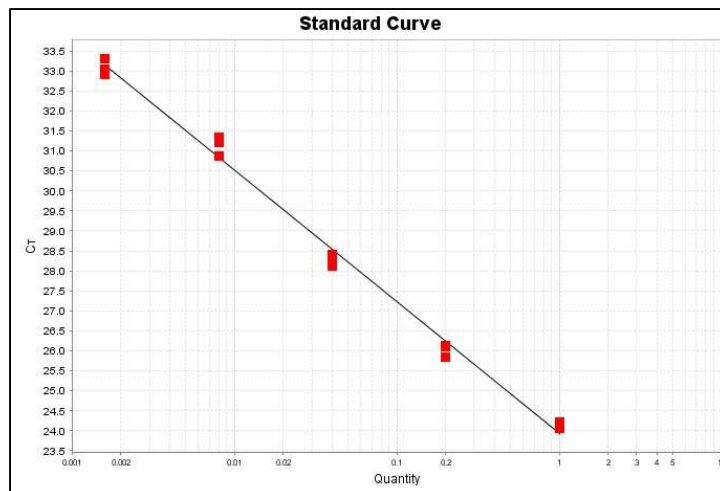


Abb. 14: qPCR-Standardkurve für Primer/Probes für den ESR1_2, unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von cDNA-Konzentrationen (1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625).

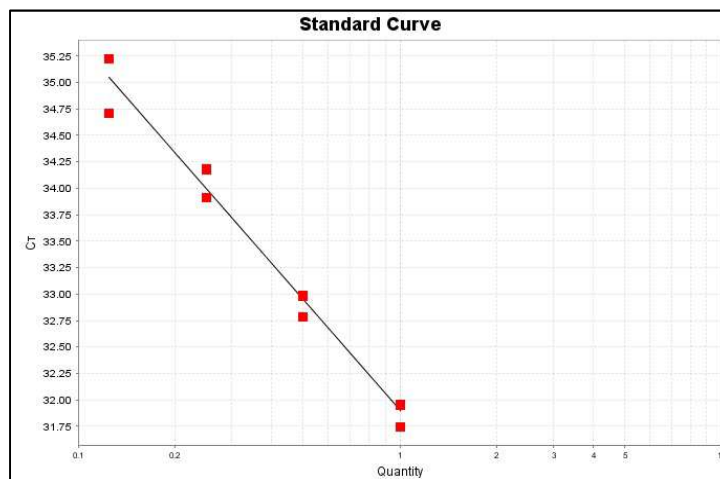


Abb. 15: qPCR-Standardkurve für Primer/Probes für den ESR2, unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von cDNA-Konzentrationen (1:1, 1:5, 1:25, 1:125).

Die Auswertung der Steigungen für die Primer/Probe-Kombinationen für ESR1 (zwei verschiedene Kombinationen), ESR2 (zwei verschiedene Kombinationen), AR und PGR sowie für die Housekeeping Gene GAPDH und B2M sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Insgesamt zeigte sich, dass sämtliche schlussendlich gewählte Kombinationen eine akzeptable Effizienz von mindestens 80% über einen weiten dynamischen Bereich von cDNA-Konzentrationen aufwiesen. Die erzielten Werte der Effizienzen flossen anschliessend in die Vergleiche der relativen Expressionslevel zwischen Kontrollgruppe und Fallgruppe ein (REST-Software).

Gen	Primer/Probe	Steigung	Effizienz (%)
Androgenrezeptor	AR_PL14	-3.66	87.4
Progesteronrezeptor	PGR_PL20	-3.76	84.5
Östrogenrezeptor α	ESR1_PL78	-3.30	100.8
Östrogenrezeptor α	ESR1_PL22	-3.43	95.8
Östrogenrezeptor β	ESR2_PL24	-3.48	93.5
GAPDH	GAPDH_PL45	-3.56	90.9
B2M	hB2M_PL42	-3.39	97.3

Tab. 10: Berechnungen der Effizienzen aller verwendeten Primer/Probe-Kombinationen aufgrund der qPCR unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von cDNA-Konzentrationen. Optimum = 100% Amplifikation

Tests mit der Primer/Probe-Kombination ESR2_PL69 zeigten sehr grosse Schwankungen. Es wurde deshalb eine alternative Primer/Probe-Kombination (ESR2_PL24) mit Erfolg entworfen und im Folgenden für ESR2 nur letztere Kombination eingesetzt.

Alle Ct-Werte wurden automatisch mit der Software des Cyclers bestimmt.

4.4.2 qPCR

Tests zur Eignung der Housekeeping Gene zeigten, dass B2M keine konstanten Expressionswerte in der Kontroll- und in der Fallgruppe hatte, sondern signifikant reguliert war. B2M wurde deshalb zur Normalisierung ausgeschlossen. GAPDH hingegen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen Kontroll- und Fallgruppe und wurde im Folgenden zur Normalisierung der qPCR-Daten verwendet.

Nachdem alle Ct-Werte mit der Software des Cyclers bestimmt waren, wurden diese mit Hilfe der REST384-Software auf mögliche signifikante Änderungen in den Expressionsraten analysiert.

Wie schon aufgrund der Standardkurven zu vermuten war, lag der ESR2 in der Kontrollgruppe unter der Detektionslimite. Auch in der Fallgruppe war keine mRNA-Expression von ESR2 zu ermitteln.

Für den ESR1 wurden zwei verschiedene Primer/Probe-Kombinationen generiert, da keine Kombination alle bekannten 14 Isoformen gleichzeitig abdeckt. Die Primer/Probe-Kombination ESR1_PL22 amplifizierte die Isoformen 5/7 und die Primer/Probe-Kombination ESR1_PL78 die Isoformen 1-4/6/8-14. Unsere Ergebnisse zeigten, dass der ESR1 im Bindegewebe der vorderen Vaginalwand sowohl der Kontrollgruppe, als auch der Fallgruppe transkribiert wurde. Ausserdem war mRNA für AR und PGR sowohl in Kontroll- und Fallgruppe vorhanden.

Insgesamt waren die Ct-Werte in der Fallgruppe nach Normalisierung höher als in der Kontrollgruppe. Dies bedeutet, dass in der Fallgruppe die Expressionslevel der entsprechenden Gene niedriger waren, als in der Kontrollgruppe. Im Einzelnen zeigte sich eine Herunterregulation von ESR1_PL22 um den Faktor 1.316 (nicht signifikant, $p=0.562$); von ESR1_PL78 um den Faktor 1.649 (nicht signifikant, $p=0.32$) und von AR_PL14 um den Faktor 1.863 (nicht signifikant, $p=0.158$). Hingegen war die Herunterregulation von PGR_PL20 um den Faktor 6.531 in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p=0.001$). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle noch dargestellt.

	ESR1_PL22	ESR1_PL78	PGR_PL20	AR_PL14
Ct-Durchschnitt (Kontrollen)	28.875	29.517	29.063	31.953
Ct-Durchschnitt (Samples)	27.615	28.627	30.267	31.177
Expressions-Rate	0.760	0.607	0.153	0.537
p-Werte (Signifikanz)	0.562	0.320	0.001	0.158

Tabelle 11: Ergebnisse der Auswertung mit der REST384-Software. Expressions-Rate = relative Expression eines bestimmten Gens der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. $p<0.05$ wurde als signifikant angenommen.

Die weitere Differenzierung nach dem Schweregrad des Deszensus (Pulsationszystozele Grad II oder III) zeigte, dass die signifikanten Veränderungen des Progesteronrezeptors den Patientinnen mit Pulsationszystozele Grad III zugeordnet werden konnten, während sie bei Patientinnen mit Pulsationszystozele Grad II nicht signifikant waren (siehe Abbildung 16).

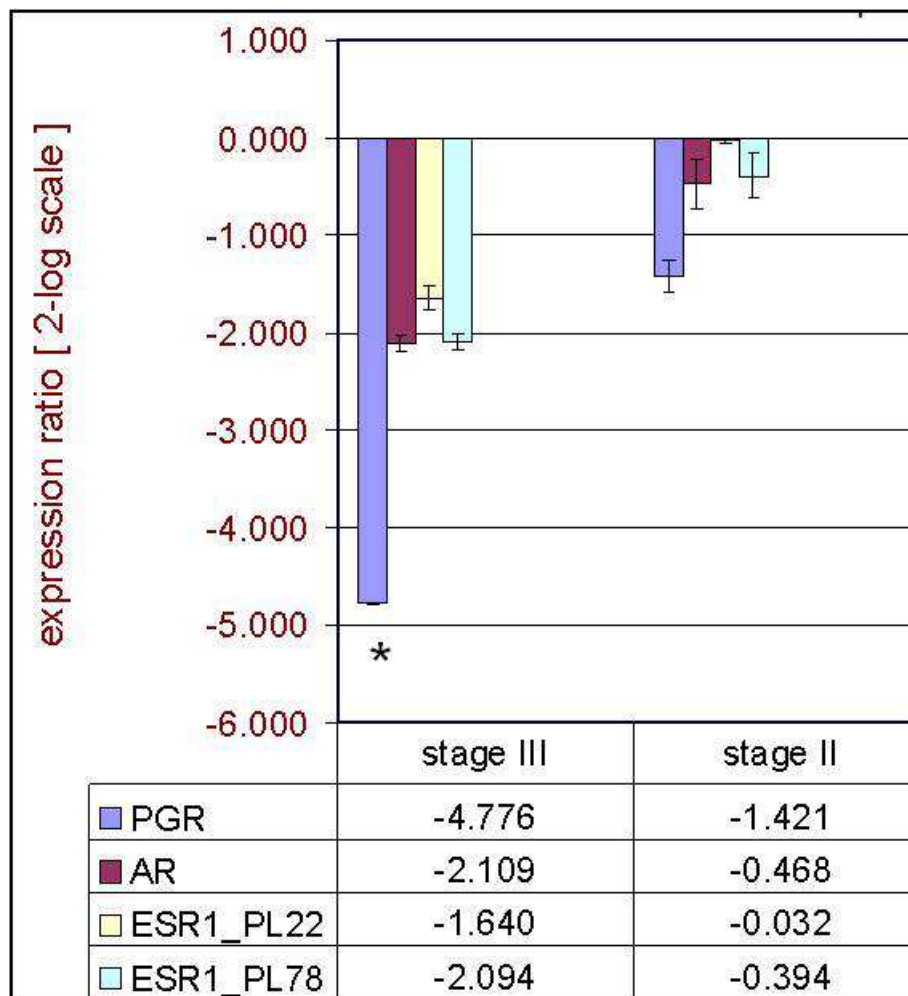


Abb. 16: Vergleich der relativen Genexpression des Progesteronrezeptors (PGR), Androgenrezeptors (AR) und Östrogenrezeptor α (ESR1, zwei Primer/Probe-Kombinationen) bei mikrodisseziertem Bindegewebe der vorderen Vaginalwand bei Patientinnen mit Zystozele Grad II (stage II) und Grad III (stage III) im Vergleich zu Kontrollen; Darstellung in 2-log Scale; * $p < 0.05$.

5. Diskussion

Ausgehend von der Hypothese, dass sowohl Steroidhormone, als auch Veränderungen im Bindegewebe eine Rolle in der Ätiologie des Genitaldeszensus spielen, haben wir in der vorliegenden Arbeit die Expression von Steroidhormon-Rezeptoren (Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptor) im Bindegewebe der vorderen Vaginalwand untersucht.

Dies ist die erste Studie, welche die Methode der Laser Capture Microdissection Microscopy (LMD) nutzte, um das Bindegewebe spezifisch aus dem Gewebsverband der Vaginalwand zu isolieren und für molekularbiologische Studien zu verwenden. Die LMD ist eine wissenschaftlich sehr hilfreiche Technik, die aber vermutlich aufgrund ihrer Komplexität bisher im Vaginalbereich nur für wenige Fragestellungen eingesetzt wurde.

Zu den Anwendungsgebieten zählt die Forensik, bei welcher die LMD vor allem für die Analyse von Abstrichen nach sexuellen Übergriffen von Bedeutung sein kann. So ergibt die Isolierung von Spermien mittels LMD im Vergleich zu herkömmlichen Methoden bessere DNA-Profile der Spermien [35, 36]. In einer Weiterentwicklung dieser Methode wurden zudem die Spermien mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, was die Identifikation der Spermien im Gemisch der Zellen eines Abstriches vereinfacht [37].

Weiter wurde die LMD für gynäkologische Krebs-Studien genutzt. Die LMD ermöglichte in diesem Zusammenhang, Genexpressionsmuster von Zervixzellen bei Patientinnen mit einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie Grad III zu untersuchen [38]. Ausserdem wurden dysplastische und morphologisch normale Zervixzellen mit der LMD getrennt und die jeweiligen Expressionsprofile bestimmt [39].

In einer weiteren Studie wurde ausserdem mittels LMD das Epithel vom restlichen vaginalen Gewebe getrennt, um die mRNA-Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) zu verschiedenen Zeitpunkten des Monatszyklus und nach einer Therapie mit Depo-Provera zu untersuchen [40].

Verschiedene Untersuchungen haben sich in der Vergangenheit mit der Expression von Steroidhormon-Rezeptoren in der Vaginalwand von Patientinnen mit und ohne Genitaldeszensus befasst [41-43]. Es ist aber als ein entschiedener Nachteil zu betrachten, dass jeweils die gesamte Vaginalwand extrahiert wurde. Ein gezielter Rückschluss auf Veränderungen im Bindegewebe dieser Patientinnen ist somit nicht möglich. In unserer Arbeit haben wir nun erstmals die LMD dazu benutzt, um Bindegewebe aus Biopsien der

vaginalen Vorderwand zu isolieren und spezifisch zu untersuchen. Allfällige Beeinflussungen der Resultate durch die Muskulatur oder das Epithel der Vagina konnten so erstmals komplett vermieden werden.

Rezeptoren von Sexualsteroiden konnten bisher an verschiedenen Stellen des weiblichen Urogenitalsystems nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle 6). Dabei wurden die Östrogenrezeptoren bisher am gründlichsten erforscht, gefolgt von den Progesteron- und Androgenrezeptoren [16].

In der Vagina und Vulva gesunder Patientinnen wurde die zelluläre Verteilung des Östrogen α -, Progesteron- und Androgenrezeptors mittels immunhistochemischer Techniken untersucht [44]. Dabei zeigte sich, dass sämtliche Rezeptoren stärker in Bindegewebszellen, als in Epithelzellen vorhanden waren, was eine vergleichsweise höhere Ansprechbarkeit der Bindegewebszellen durch Steroidhormone nahelegt.

Bei Patientinnen mit Genitaldeszensus ist bisher die Expression von Steroidhormon-Rezeptoren noch wenig untersucht worden. In vorhandenen Studien wurden oftmals das Lig. cardinale und Lig. sacrouterinum biopsiert, da diese wichtig sind, um den Uterus in seiner physiologischen Lage zu halten [45] und da ein Defekt des Lig. cardinale eine häufig diagnostizierte Veränderung bei betroffenen Frauen ist [46].

Die Entdeckung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Lig. sacrouterinum bestärkte die Hypothese, dass Steroidhormone eine Rolle für den Support des Beckenbodens spielen könnten [47]. In Biopsien des M. levator ani wurden Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den Zellkernen von Bindegewebszellen und von Zellen der Skelettmuskulatur lokalisiert [48], wogegen in einer späteren Studie weder Östrogen α - noch Progesteronrezeptoren in den Zellkernen von Muskelzellen des M. levator ani gemessen werden konnten [49]. Letztgenannte Untersuchung wurde jedoch nicht mit menschlichem Gewebe sondern mit Biopsien von Rhesusaffen durchgeführt. Die Rhesusaffen waren alle ovariectomiert und teils unter Hormonersatz-Therapie (HRT). Interessant war, dass Östrogen α - und Progesteronrezeptoren in den Zellkernen von vaginalen Fibroblasten, Zellen der glatten Muskulatur und basalen Epithelzellen vorhanden waren, sofern die Rhesusaffen eine HRT erhielten. Bei Rhesusaffen ohne eine HRT konnte der Progesteronrezeptor in keiner der erwähnten Zellen gemessen werden, wogegen der Östrogenrezeptor unabhängig von einer HRT messbar war.

Ewies et al. [46] untersuchten die Expression von Steroidhormon-Rezeptoren im Lig. cardinale bei Frauen mit einem Genitaldeszensus Grad III (Patientengruppe) und verglichen diese mit einer Kontrollgruppe ohne Genitaldeszensus (Grad 0). In den beiden Gruppen wurde weiter unterschieden, ob die Frauen prä- oder postmenopausal waren und ob sie eine HRT erhielten. Der Östrogenrezeptor α hatte eine signifikant höhere Expressionsrate in der Patientengruppe (postmenopausal und ohne HRT) als in der Kontrollgruppe. Ebenfalls signifikant höher exprimiert waren der Androgenrezeptor in der Patientengruppe (prä- und postmenopausal, jeweils ohne HRT) und der Progesteronrezeptor in der Patientengruppe (prämenopausal) als in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war der Östrogenrezeptor β signifikant höher exprimiert in der Kontrollgruppe (prämenopausal) als in der Patientengruppe.

Die Resultate dieser Studie stehen somit im klaren Gegensatz zu unseren Resultaten. Verschiedene Umstände können durchaus die Unterschiede erklären. So stammten unsere Biopsien bei der Kontrollgruppe aus dem apikalen Abschnitt der vaginalen Vorderwand bzw. aus der vaginalen Vorderwand über der Zystozele in der Fallgruppe. Dank der LMD war es uns weiter möglich spezifisch das Bindegewebe aus den Biopsien zu analysieren.

Auch die Methodik unterschied sich. Ewies et al. untersuchten die Expression mittels Immunhistochemie und konnten so den Anteil der Zellen vergleichen, in welchen der jeweilige Rezeptor exprimiert wurde und in welchen nicht. Die in unserer Studie angewandte Methode basierte auf einer RNA-Extraktion, RT-Reaktion und anschliessender qPCR. Dabei berücksichtigten wir in der qPCR sämtliche Isoformen der Rezeptoren.

Interethnische Unterschiede in Bezug auf das Risiko einen Genitaldeszensus zu entwickeln, werden diskutiert [9]. In der Auswahl der Patientinnen in unsere Studie wurde dieses Kriterium weder angewandt noch untersucht. Ewies et al. [46] schlossen jedoch nur Frauen kaukasischer Herkunft in ihre Studie ein. Weiter unterteilten sie die zu vergleichenden Gruppen in Untergruppen hinsichtlich Menopausenstatus (prä- oder postmenopausal) und HRT (postmenopausal mit oder ohne HRT).

Die Expression des Androgenrezeptors im Lig. cardinale und in der Vaginalwand bei Patientinnen mit Genitaldeszensus wurde in einer in China durchgeführten Studie genauer erforscht [41]. Bei den Studienteilnehmerinnen wurden zusätzlich das Serumtestosteron und das sexualhormonbindende Globulin (SHBG) bestimmt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Expression des Androgenrezeptors bei Patientinnen mit Genitaldeszensus signifikant

erhöht im Lig. cardinale und in der Vaginalwand. Die Serumkonzentrationen von Testosteron und SHBG unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Die Tatsache, dass in dieser Studie die Messungen mittels Western Blot und Immunhistochemie durchgeführt wurden, mag der Grund für die von unseren Ergebnissen abweichenden Resultate sein.

Androgene wie das Testosteron induzieren eine Zunahme der Muskel- und führen zu einer Reduktion der Fettmasse. Bekannt ist ebenfalls, dass der Beckenboden und der untere Harntrakt auf Testosteron ansprechen [50]. Die genaue Wirkung auf den Beckenboden und die Rolle in Bezug auf die Ätiologie des Genitaldeszensus müssen jedoch weiter ergründet werden.

In einer weiteren Studie wurde das Vorkommen von Östrogen-, Progesteronrezeptoren, p53 und p21 im Lig. sacrouterinum bei postmenopausale Frauen mit und ohne Genitaldeszensus verglichen [51]. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren sämtliche Parameter signifikant tiefer in der Fallgruppe. Die Resultate stimmen teilweise mit unseren überein (Progesteronrezeptor). Die Östrogenrezeptoren waren auch bei uns herunterreguliert, jedoch nicht signifikant. Doch gilt es, eine gewisse Diskrepanz zwischen den beiden Studien zu berücksichtigen: So waren die Studienteilnehmerinnen der erwähnten Studie [51] koreanischer Herkunft, die Proben stammten von unterschiedlichen Biopsiestellen und die angewandten Messmethoden waren nicht einheitlich. Ausserdem wurde nicht zwischen dem Östrogenrezeptor α und β differenziert.

Eine Studie aus China ergab, dass das Vorkommen von Östrogenrezeptoren auch bei prämenopausalen Frauen mit Genitaldeszensus signifikant tiefer war als in der Kontrollgruppe [52]. Die Biopsien stammten aus dem Lig. cardinale und dem Lig. sacrouterinum. Die Östrogenrezeptoren wurden immunhistochemisch gemessen. Doch auch hier ist ein Vergleich mit unserer Studie aus den zuvor erwähnten Gründen (Herkunft der Patientinnen, Biopsiestellen, Messmethode) nur unter Vorbehalt möglich.

Die Expression von Steroidhormon-Rezeptoren (Östrogen β - und Progesteronrezeptor) variiert mit dem Grad des Genitaldeszensus, wie eine Studie aus Deutschland zeigen konnte [42]. Die Biopsien stammten aus der vorderen Vaginalwand und dem periurethralen Gewebe. Mittels RT-PCR wurde die Expression vom Östrogen α -, Östrogen β - und Progesteronrezeptor gemessen. Patientinnen mit Genitaldeszensus höheren Grades hatten eine signifikant höhere Expression des Progesteronrezeptors im periurethralen Gewebe und eine signifikant tiefere Expression des Östrogenrezeptors β im vaginalen Gewebe als

Patientinnen mit geringgradigem Genitaldeszensus. Patientinnen mit zusätzlicher Drangsymptomatik hatten eine signifikant tiefere Progesteronrezeptor-Expression in der vorderen Vaginalwand. Patientinnen mit Genitaldeszensus hatten auch in unserer Untersuchung eine reduzierte Expression des Progesteronrezeptors. In unserem Kollektiv wurde aber nicht unterschieden, ob eine zusätzliche Drangsymptomatik vorlag oder nicht. Dieselben Autoren konnten früher zeigen, dass der Progesteronrezeptor in der Vagina signifikant höher exprimiert war als im periurethralen Gewebe [43].

Letztlich lassen sich die verschiedenen Studienergebnisse nur schwer miteinander vergleichen, da verschiedene Messtechniken, Lokalisationen, Patientinnenkollektive und Ausprägung des Genitaldeszensus sowie anatomische Regionen der Biopsieentnahmestellen angewandt resp. untersucht wurden. In unserer Arbeit fokussierten wir auf den Vergleich zwischen Patientinnen mit und ohne Zystozele und wählten als Grenze zur Dichotomisierung mindestens eine Zystozele Grad II für die Fallgruppe. Zudem – und dies mag jedoch gerade die Stärke unserer Arbeit sein – untersuchten wir gezielt dasjenige Kompartiment der vorderen Vaginalwand, welches aus Bindegewebe besteht.

Unsere Studie ergab, dass einzig der Progesteronrezeptor im Bindegewebe der vorderen Vaginalwand bei Patientinnen mit Genitaldeszensus signifikant herunterreguliert ist.

Chen et al. gingen in ihrer Studie von der Hypothese aus, dass Varianten des Progesteronrezeptor-Gens dessen Expression beeinflussen und ein Risiko für einen Genitaldeszensus darstellen könnten [53]. Sie untersuchten zwei Polymorphismen des Progesteronrezeptors: rs500760 (Exon 8 A/G) und rs484389 (3'-UTR C/T). Wobei rs484389 (Genotyp CT) signifikant häufiger bei Patientinnen mit Genitaldeszensus exprimiert war und daher ein genetisch bedingter Risikofaktor dafür sein könnte.

Eine quantitative Bestimmung verschiedener Gestagene und Corticosteroide im Urin bei Frauen mit und ohne Genitaldeszensus ergab, dass 17 α -Hydroxyprogesteron bei betroffenen Frauen in signifikant tieferen Konzentrationen vorzufinden war [54]. Bei den restlichen Parametern, mit Ausnahme von 11-Deoxycorticosteron, wurden keine signifikant tieferen Konzentrationen gemessen. Dies deutet darauf hin, dass Progesteron ein Faktor in der Pathogenese des Genitaldeszensus sein könnte und infolgedessen 17 α -Hydroxyprogesteron ein Biomarker dafür sein könnte [54]. Diese Resultate lassen sich mit denen von Zong et al. vereinbaren. Sie wiesen nach, dass die Aktivität von MMP13 (Gen für Kollagenase 3) durch

Progesteron und Östrogen supprimiert wird, was auf eine protektive Funktion von Progesteron und Östrogen auf die Qualität des Beckenbodens hindeutet [55].

Abschliessend ist zu sagen, dass weitere Forschung nötig ist, um die Ätiologie und Pathogenese des Genitaldeszensus zu verstehen. Aufgrund unserer Untersuchung und in der Zusammenschau mit der aktuellen publizierten Datenlage scheinen Steroidhormone und deren Rezeptoren involviert zu sein. Der genaue Pathomechanismus ist allerdings noch unbekannt.

Bisher durchgeführte Studien sind schwierig miteinander vergleichbar. Höchst selten stimmen elementare Punkte wie Patientinnenauswahl, Einteilung der Patientinnen, Ort der Biopsieentnahme, Methoden und Zielparameter überein. Dies kann mitunter als Grund für die in der Literatur gefunden Widersprüche angesehen werden.

Um ein wenig Klarheit in dieses komplexe Themengebiet zu bringen, haben wir uns in unserer Arbeit auf das Bindegewebe fokussiert. Mit der LMD war es uns möglich, das Bindegewebe auf eine akkurate Art und Weise zu isolieren. Aus unserer Sichtweise hat die LMD für Studien, wie wir sie durchführten, einen unschätzbaren Stellenwert. Endlich kann das Gewebe kompartmentsspezifisch ohne „Kontamination“ anderer Zellen untersucht werden. Zudem kann man so die verschiedenen anatomischen Regionen hinsichtlich ihrer Bindegewebsstruktur kompartimentsbezogen vergleichen.

In unserer Studie konnten wir mit Hilfe der LMD zeigen, dass von den Steroidhormon-Rezeptoren im Bindegewebe der vorderen Vaginalwand von Patientinnen mit Zystozele nur der Progesteronrezeptor signifikant herunterreguliert ist. Inwiefern unsere Resultate auf andere Gewebsstrukturen und Senkungszustände (z.B. Deszensus uteri, Rektozele oder Enterozele und deren Kombinationen) zutreffen, muss noch erforscht werden. Eine wichtige, aber ungeklärte Frage ist, ob die erhaltenen Ergebnisse Ursache oder Folge des Genitaldeszensus sind. Mit unserer Arbeit haben wir somit einen von vielen Schritten gemacht, um die Ätiologie des Genitaldeszensus mitzuergründen, sicher auch in der Hoffnung, künftig effiziente Präventions- und Therapiemöglichkeiten erlangen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Dietz, H.P., *The aetiology of prolapse*. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2008. 19(10): p. 1323-9.
2. Abrams, P., et al., *Fourth International Consultation on Incontinence Recommendations of the International Scientific Committee: Evaluation and treatment of urinary incontinence, pelvic organ prolapse, and fecal incontinence*. Neurourol Urodyn, 2010. 29(1): p. 213-40.
3. Kobashi, K.C. and G.E. Leach, *Pelvic prolapse*. J Urol, 2000. 164(6): p. 1879-90.
4. Lermann, J.H., et al., *Genitalvorfall: Symptomatik, Diagnostik und Therapie*. Frauenheilkunde up2date, 2010. 2: p. 111-33.
5. Muir, T.W., K.J. Stepp, and M.D. Barber, *Adoption of the pelvic organ prolapse quantification system in peer-reviewed literature*. Am J Obstet Gynecol, 2003. 189(6): p. 1632-5; discussion 1635-6.
6. Bump, R.C., et al., *The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction*. Am J Obstet Gynecol, 1996. 175(1): p. 10-7.
7. Luber, K.M., S. Boero, and J.Y. Choe, *The demographics of pelvic floor disorders: current observations and future projections*. Am J Obstet Gynecol, 2001. 184(7): p. 1496-501; discussion 1501-3.
8. Swift, S., et al., *Pelvic Organ Support Study (POSST): the distribution, clinical definition, and epidemiologic condition of pelvic organ support defects*. Am J Obstet Gynecol, 2005. 192(3): p. 795-806.
9. Hendrix, S.L., et al., *Pelvic organ prolapse in the Women's Health Initiative: gravity and gravidity*. Am J Obstet Gynecol, 2002. 186(6): p. 1160-6.
10. Subak, L.L., et al., *Cost of pelvic organ prolapse surgery in the United States*. Obstet Gynecol, 2001. 98(4): p. 646-51.
11. Olsen, A.L., et al., *Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence*. Obstet Gynecol, 1997. 89(4): p. 501-6.
12. Clark, A.L., et al., *Epidemiologic evaluation of reoperation for surgically treated pelvic organ prolapse and urinary incontinence*. Am J Obstet Gynecol, 2003. 189(5): p. 1261-7.
13. Schaffer, J.I., C.Y. Wai, and M.K. Boreham, *Etiology of pelvic organ prolapse*. Clin Obstet Gynecol, 2005. 48(3): p. 639-47.
14. Jelovsek, J.E., C. Maher, and M.D. Barber, *Pelvic organ prolapse*. Lancet, 2007. 369(9566): p. 1027-38.
15. Mant, J., R. Painter, and M. Vessey, *Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford Family Planning Association Study*. Br J Obstet Gynaecol, 1997. 104(5): p. 579-85.
16. Rechberger, T. and P. Skorupski, *The controversies regarding the role of estrogens in urogynecology*. Folia Histochem Cytobiol, 2007. 45 Suppl 1: p. 17-21.
17. Lien, K.C., et al., *Levator ani muscle stretch induced by simulated vaginal birth*. Obstet Gynecol, 2004. 103(1): p. 31-40.
18. Peschers, U.M., et al., *Levator ani function before and after childbirth*. Br J Obstet Gynaecol, 1997. 104(9): p. 1004-8.
19. Snooks, S.J., et al., *Damage to the innervation of the pelvic floor musculature in chronic constipation*. Gastroenterology, 1985. 89(5): p. 977-81.

20. McIntyre, M., C. Goudelocke, and E.S. Rovner, *An update on surgery for pelvic organ prolapse*. Curr Opin Urol, 2010. 20(6): p. 490-4.
21. Ellerkmann, R.M., et al., *Correlation of symptoms with location and severity of pelvic organ prolapse*. Am J Obstet Gynecol, 2001. 185(6): p. 1332-7; discussion 1337-8.
22. Burrows, L.J., et al., *Pelvic symptoms in women with pelvic organ prolapse*. Obstet Gynecol, 2004. 104(5 Pt 1): p. 982-8.
23. de Boer, T.A., et al., *Pelvic organ prolapse and overactive bladder*. Neurourol Urodyn, 2010. 29(1): p. 30-9.
24. Cooke, T.J. and A.E. Gousse, *A historical perspective on cystocele repair--from honey to pessaries to anterior colporrhaphy: lessons from the past*. J Urol, 2008. 179(6): p. 2126-30.
25. Salvatore, S., G. Siesto, and M. Serati, *Risk factors for recurrence of genital prolapse*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2010. 22(5): p. 420-4.
26. Tunn, R., E. Hanzal, and D. Perucchini, *Therapie der Belastungsinkontinenz*, in *Urogynäkologie in Praxis und Klinik*. 2010, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG p. 161-84.
27. Heesakkers, J.P. and M.E. Vierhout, *Prolapse surgery: which technique and when?* Curr Opin Urol, 2011. 21(4): p. 281-5.
28. Anger, J.T., et al., *The effect of concomitant prolapse repair on sling outcomes*. J Urol, 2008. 180(3): p. 1003-6.
29. FDA. *FDA Safety Communications: UPDATE on serious complications associated with transvaginal placement of surgical mesh for pelvic organ prolapse*. 2011 [cited; Available from: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm262435.htm>.
30. De Geyter, C., *EGONEbasic: Hormonelle Abklärungen*. 2011. p. 4-6.
31. Lachowsky, M. and R.E. Nappi, *The effects of oestrogen on urogenital health*. Maturitas, 2009. 63(2): p. 149-51.
32. Sartori, M.G., et al., *Sexual steroids in urogynecology*. Climacteric, 2011. 14(1): p. 5-14.
33. Sonderegger, P., *Vorlesungsunterlagen "Signalübertragung"*. 2007, Universität Zürich. p. 61-6.
34. Spinass, G.A. and P.U. Heitz, *Vorlesungsunterlagen "Grundlagen der Endokrinologie"*. 2004, Universität Zürich. p. 18-9.
35. Elliott, K., et al., *Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides*. Forensic Sci Int, 2003. 137(1): p. 28-36.
36. Liu, F., et al., *Isolating sperm cells by laser capture microdissection technique from mixture sample*. Fa Yi Xue Za Zhi, 2011. 27(1): p. 33-5, 42.
37. Vandewoestyne, M., et al., *Automatic detection of spermatozoa for laser capture microdissection*. Int J Legal Med, 2009. 123(2): p. 169-75.
38. Hildebrandt, E.F., et al., *Liquid-based pap smears as a source of RNA for gene expression analysis*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2003. 11(4): p. 345-51.
39. Gu, Y., et al., *Proteomic analysis of high-grade dysplastic cervical cells obtained from ThinPrep slides using laser capture microdissection and mass spectrometry*. J Proteome Res, 2007. 6(11): p. 4256-68.
40. Yao, X.D., et al., *Expression of Toll-like receptors in murine vaginal epithelium is affected by the estrous cycle and stromal cells*. J Reprod Immunol, 2007. 75(2): p. 106-19.

41. Chen, Y.S. and K.Q. Hua, *Expression of androgen receptor in the vaginal wall and cardinal ligament of patients with pelvic organ prolapse*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2008. 88(41): p. 2920-3.
42. Skala, C.E., et al., *The effect of genital and lower urinary tract symptoms on steroid receptor expression in women with genital prolapse*. Int Urogynecol J, 2011. 22(6): p. 705-12.
43. Skala, C.E., et al., *The effect of hormonal status on the expression of estrogen and progesterone receptor in vaginal wall and periurethral tissue in urogynecological patients*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2010. 153(1): p. 99-103.
44. Vermeirsch, H., W. Van den Broeck, and P. Simoens, *Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in canine vaginal and vulvar tissue and their relation to sex steroid hormone concentrations*. Reprod Fertil Dev, 2002. 14(3-4): p. 251-8.
45. Chung da, J. and S.W. Bai, *Roles of sex steroid receptors and cell cycle regulation in pathogenesis of pelvic organ prolapse*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006. 18(5): p. 551-4.
46. Ewies, A.A., J. Thompson, and F. Al-Azzawi, *Changes in gonadal steroid receptors in the cardinal ligaments of prolapsed uteri: immunohistomorphometric data*. Hum Reprod, 2004. 19(7): p. 1622-8.
47. Mokrzycki, M.L., et al., *Estrogen and progesterone receptors in the uterosacral ligament*. Obstet Gynecol, 1997. 90(3): p. 402-4.
48. Smith, P., et al., *Localization of steroid hormone receptors in the pelvic muscles*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1993. 50(1): p. 83-5.
49. Otto, L.N., et al., *The rhesus macaque as an animal model for pelvic organ prolapse*. Am J Obstet Gynecol, 2002. 186(3): p. 416-21.
50. Ho, M.H., N.N. Bhatia, and S. Bhasin, *Anabolic effects of androgens on muscles of female pelvic floor and lower urinary tract*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2004. 16(5): p. 405-9.
51. Bai, S.W., et al., *Roles of estrogen receptor, progesterone receptor, p53 and p21 in pathogenesis of pelvic organ prolapse*. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2005. 16(6): p. 492-6.
52. Lang, J.H., et al., *Estrogen levels and estrogen receptors in patients with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse*. Int J Gynaecol Obstet, 2003. 80(1): p. 35-9.
53. Chen, H.Y., et al., *Progesterone receptor polymorphism is associated with pelvic organ prolapse risk*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2009. 88(7): p. 835-8.
54. Shama, N., et al., *Quantitative determination of progesterones and corticosteroids in human urine using gas chromatography/mass spectrometry: application to pelvic organ prolapse patients*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. 22(7): p. 959-64.
55. Zong, W., L.A. Meyn, and P.A. Moalli, *The amount and activity of active matrix metalloproteinase 13 is suppressed by estradiol and progesterone in human pelvic floor fibroblasts*. Biol Reprod, 2009. 80(2): p. 367-74.

7. Danksagung

Im Besonderen möchte ich mich bei Herr Dr. med. David Scheiner bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr für Diskussionen aus der Klinik und war eine grosse Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation. Er kümmerte sich um die Genehmigung unserer Studie durch die Ethikkommission und um die Einverständniserklärungen der Patientinnen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei ihm und Frau Dr. med. Cornelia Betschart dafür bedanken, dass sie immer wieder Kontakt mit mir aufnahmen, sobald Patientinnen zu einer Studienteilnahme eingewilligt hatten und mir mitteilten, wann ich die Biopsien entgegennehmen konnte.

Die Zusammenarbeit mit ihnen hat mir viel Freude bereitet und ich wünsche ihnen für die Zukunft nur das Beste.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Caroline Maae für ihre Unterstützung bei den einzelnen Arbeitsschritten im Labor bedanken. Für mich neue Themengebiete wie die qPCR, erklärte sie mir stets kompetent und geduldig. Selbst wenn viel Arbeit anstand, konnte sie mich immer wieder aufs Neue motivieren und begeistern. Was für mich zu Beginn wie ein grosser Berg aussah, stellte sich als eine spannende und äusserst lehrreiche Erfahrung heraus.

Ich bedanke mich bei Frau Therese Lehmann für die Einführung in die Laborarbeit und ihre Hilfe. Bei Problemen oder Unklarheiten konnte ich stets auf sie zählen.

Frau Emina Besic Gyenge danke ich vielmals für die Einführung in das EndNote-Programm. Ich danke meiner Studienfreundin, Livia Kammerlander, für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Meinem Ehemann Michael danke ich vielmals, dass er mich stets unterstützte und den Aufwand des Korrekturlesens nicht scheute. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei meiner Freundin, Daniela Hinnen, bedanken. Sie stand mir mit ihrem kompetenten Fachwissen bei grammatikalischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich auf meinem Weg begleitet und mir das Studium ermöglicht haben.

8. Curriculum Vitae

Name Ackerknecht-Koch

Vorname Annemarie

Geburtsdatum 10.06.1986

Geburtsort Frauenfeld TG

Bürgerort Zürich ZH

08.1993 – 07.1999 Primarschule Woogacker, Wagenhausen TG

08.1999 – 07-2001 Sekundarschule, Eschenz TG

08.2001 – 07. 2005 Kantonsschule, Frauenfeld TG

- Schwerpunktfach: Biologie/Chemie

07.2005 – 07.2006 AuPair-Jahr in den USA, Topeka KS

08.2006 – 10.2012 Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität
Zürich

10.2012 Eidgenössisches Examen Humanmedizin an der Universität Zürich

seit 11.2012 Assistenzärztin, Frauenklinik Kantonsspital Frauenfeld